

**MODULATION DER THROMBOZYTENAGGREGATION
UND THROMBOXANPRODUKTION IN VITRO
IM PLÄTTCHENREICHEN PLASMA UND VOLLBLUT**

CHRISTOPH SALAT

1985

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik III der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns)

MODULATION DER THROMBOZYTENAGGREGATION
UND THROMBOXANPRODUKTION IN VITRO IM
PLÄTTCHENREICHEN PLASMA UND VOLLBLUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Salat
aus München

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Hiller
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1986

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGEN

ADP = Adenosindiphosphat

ASS = Acetylsalicylsäure

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

DTS = dichtes tubuläres System

GARP = goat-anti-rabbit-plasma

IRP = immuno rabbit plasma

NRS = normal rabbit serum

P₁ = Proband 1

P₂ = Proband 2

PAF = Plättchen-aktivierender Faktor

PG = Prostaglandin, z.B. PGD₂ = Prostaglandin D₂

PGI₂ = Prostacyclin

PPP = plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)

PRP = plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)

TxA₂ = Thromboxan A₂

TxB₂ = Thromboxan B₂

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
 - 1.1. Aktuelle klinische Bedeutung von Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation
 - 1.2. Physiologie der Hämostase
 - 1.2.1. Thrombozyten und Gefäßwand
 - 1.2.2. Das Prostaglandin-Thromboxan-System
 - 1.2.2.1. Physiologie der Prostaglandine
 - 1.2.2.2. Der thrombozytäre und endotheliale Prostaglandin-metabolismus
 - 1.2.2.3. Pathophysiologische Bedeutung des Prostaglandin-stoffwechsels in Thrombozyten und Endothelzellen
 - 1.2.3. Das plasmatische Gerinnungssystem
 - 1.3. Eingriffsmöglichkeiten in Hämostase und Prostaglandinstoffwechsel
 - 1.4. Ziel der Arbeit
2. Material und Methoden
 - 2.1. Reagenzien
 - 2.1.1. Die aggregationsinduzierenden Substanzen
 - 2.1.1.1. Kollagen
 - 2.1.1.2. ADP
 - 2.1.1.3. Arachidonsäure
 - 2.1.1.3.1. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma
 - 2.1.1.3.2. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut
 - 2.1.1.4. Ristocetin
 - 2.1.2. Auf aggregationshemmende Wirkung untersuchte Substanzen
 - 2.1.2.1. Acetylsalicylsäure (ASS)
 - 2.1.2.2. Indomethacin
 - 2.1.2.3. Piroxicam
 - 2.1.2.4. UK 37,248 (Dazoxiben)
 - 2.1.2.5. UK 38,485

- 2.1.2.6. BM 13.177
- 2.1.2.7. Bezafibrat (BM 15.075)
- 2.1.3. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge
- 2.1.3.1. Herstellung der Lösung zur Reaktionsbeendigung
- 2.1.3.2. Reagenzien zur radioimmunologischen Thromboxanbestimmung
- 2.2. Messung der Aggregation im plättchenreichen Plasma
- 2.2.1. Thrombozytenaufbereitung
- 2.2.1.1. Gewinnung von plättchenreichem Plasma
- 2.2.1.2. Gewinnung von plättchenarmem Plasma
- 2.2.1.3. Herstellung von standardisiertem plättchenreichem Plasma
- 2.2.2. Durchführung der Aggregationsmessung im plättchenreichen Plasma
- 2.2.2.1. Geräte
- 2.2.2.2. Ablauf des Aggregationsversuchs
- 2.2.2.3. Typische Aggregationskurven ohne Inhibitor und Auswertungskriterien
- 2.2.2.3.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation
- 2.2.2.3.2. Die ADP-induzierte Aggregation
- 2.2.2.3.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation
- 2.2.2.3.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation
- 2.3. Messung der Aggregation im Vollblut
- 2.3.1. Methode der Vollblutaggregometrie
- 2.3.2. Durchführung der Aggregationsmessung im Vollblut
- 2.3.3. Typische Aggregationskurven ohne Inhibitor und Auswertungskriterien
- 2.4. Messung der Thromboxan-Freisetzung nach Kollagen-induzierter Aggregation in plättchenreichem Plasma und Vollblut in Gegenwart der Inhibitoren
- 2.4.1. Probengewinnung
- 2.4.1.1. Vorgehen im plättchenreichen Plasma
- 2.4.1.2. Vorgehen im Vollblut
- 2.4.2. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)
- 2.5. Überblick über das methodische Vorgehen

- 3. Ergebnisse
- 3.1. Aggregationsmessung - Beeinflussung durch Inhibitoren
 - 3.1.1. Darstellung der Aggregationsprotokolle eines Probanden am Beispiel UK 37,248
 - 3.1.1.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248
 - 3.1.1.2. Die ADP-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248
 - 3.1.1.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248
 - 3.1.1.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248
 - 3.1.2. Ergebnisse der Versuchsreihen
 - 3.1.2.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation
 - 3.1.2.1.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma
 - 3.1.2.1.2. Die Kollagen-induzierte Aggregation im Vollblut
 - 3.1.2.1.3. Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse im im plättchenreichen Plasma und Vollblut
 - 3.1.2.2. Die ADP-induzierte Aggregation
 - 3.1.2.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation
 - 3.1.2.3.1. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma
 - 3.1.2.3.2. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut
 - 3.1.2.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation
- 3.2. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge nach Kollagen-induzierter Aggregation in Gegenwart eines Inhibitors
 - 3.2.1. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge im plättchenreichen Plasma
 - 3.2.2. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge im Vollblut
- 3.3. Überblick über die Ergebnisse

- 4. Diskussion
 - 4.1. Methodik
 - 4.2. Die aggregationsinduzierenden Substanzen
 - 4.2.1. Kollagen
 - 4.2.1.1. Der Mechanismus der Kollagen-induzierten Aggregation
 - 4.2.1.2. Vergleich der Kollagen-induzierten Aggregation im plättchenreichen Plasma und Vollblut ohne Inhibitorzugabe
 - 4.2.1.3. Die Kollagen-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren
 - 4.2.2. ADP
 - 4.2.2.1. Der Mechanismus der ADP-induzierten Aggregation
 - 4.2.2.2. Vergleich der ADP-induzierten Aggregation im plättchenreichen Plasma und Vollblut ohne Inhibitorzugabe
 - 4.2.2.3. Die ADP-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren
 - 4.2.3. Arachidonsäure
 - 4.2.3.1. Der Mechanismus der Arachidonsäure-induzierten Aggregation
 - 4.2.3.2. Vergleich der Arachidonsäure-induzierten Aggregation im plättchenreichen Plasma und Vollblut ohne Inhibitorzugabe
 - 4.2.3.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren
 - 4.2.4. Ristocetin
 - 4.2.4.1. Der Mechanismus der Ristocetin-induzierten Aggregation
 - 4.2.4.2. Die Ristocetin-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma ohne Inhibitorzugabe
 - 4.2.4.3. Die Ristocetin-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren
 - 4.3. Die Inhibitoren
 - 4.3.1. Acetylsalicylsäure (ASS)

- 4.3.1.1. Wirkungsweise von ASS und Probleme der klinischen Anwendung als Thrombozytenaggregationshemmer
- 4.3.1.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von ASS: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.2. Indomethacin
 - 4.3.2.1. Wirkungsweise von Indomethacin
 - 4.3.2.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Indomethacin: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.3. Piroxicam
 - 4.3.3.1. Wirkungsweise von Piroxicam
 - 4.3.3.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Piroxicam: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.4. UK 37,248 (Dazoxiben)
 - 4.3.4.1. Wirkungsweise von UK 37,248
 - 4.3.4.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von UK 37,248: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.5. UK 38,485
 - 4.3.5.1. Wirkungsweise von UK 38,485
 - 4.3.5.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von UK 38,485: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.6. BM 13.177
 - 4.3.6.1. Wirkungsweise von BM 13.177
 - 4.3.6.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von BM 13.177: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.7. Bezafibrat (BM 15.075)
 - 4.3.7.1. Wirkungsweise von Bezafibrat
 - 4.3.7.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Bezafibrat: Einfluß und Folgerungen
- 4.3.8. Überblick über die Wirkungsweise der Inhibitoren und mögliche Konsequenzen unter physiologischen Bedingungen
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Aktuelle klinische Bedeutung von Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation

Ein gut funktionierendes Zusammenspiel der für die Hämostase entscheidenden Trias Blutzellen, Gefäßwand und Plasma ist für den menschlichen Organismus von existentieller Bedeutung.

Vor allem die mögliche pathogenetische Bedeutung der Thrombozyten bei der Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen, die in den westlichen Industrienationen seit Jahren an der Spitze der Todesursachen stehen, hat das Interesse an Funktion und Stoffwechsel der Thrombozyten sowie an ihrer Interaktion mit der Gefäßwand stark erhöht.

Eine wesentliche Bestätigung für die Annahme einer thrombozytären Beteiligung bei der Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen war der Nachweis einer mitogen wirkenden Substanz, die bei einer Endothelläsion und nachfolgender Thrombozytenaggregation aus diesen freigesetzt wird und eine Stimulierung des Wachstums glatter Muskelzellen der Gefäßwand nach sich zieht. Dies kann, vor allem bei chronischer Schädigung, durch Verdickung der Gefäßwand, verminderte nutritive Versorgung und Lipideinlagerung zur Frühphase der arteriosklerotischen Gefäßwandschädigung führen (117). Diese wiederum prädisponiert zu weiterer Thrombozytenaggregation, ein Circulus vitiosus entsteht.

Bei vielen anderen Krankheiten, oft im Zusammenhang mit der Arteriosklerose, vor allem bei thrombotischen und thromboembolischen Komplikationen, wird die Bedeutung einer erhöhten Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten diskutiert. So dürfte sie bei ischämischen Herzmuskelerkrankungen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt oder plötzlichem Herztod eine Rolle spielen (54,81).

Auch die an künstlichen Oberflächen wie z.B. Gefäßprothesen oder künstlichen Herzklappen auftretende Aktivierung der Thrombozyten mit folgender Hyperaggregabilität stellt ein klinisches Problem dar (28).

Weiterhin kann bei der Pathogenese zerebraler Erkrankungen eine Mitwirkung der Thrombozyten mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden. So konnte Couch eine Hyperaggregabilität der Plättchen bei Apoplexie oder transitorisch ischämischer Attacke zeigen (34).

Dies wurde in ähnlicher Weise für Thrombozyten bei Patienten mit Diabetes mellitus festgestellt, bei denen sich Aspekte der Angiopathien durch eine abnorme Thrombozytenfunktion erklären lassen (23,79,97).

Auch ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenaggregation und Tumormetastasierung wird erörtert. Karpatkin (69) konnte eine Korrelation zwischen der Fähigkeit einiger Tumorzellen, Thrombozyten in vitro zu aggregieren, und ihrer Metastasierungsneigung feststellen.

Die wenigen genannten Beispiele machen Bemühungen verständlich, therapeutisch auf die Funktion der Thrombozyten einzuwirken.

1.2. Physiologie der Hämostase

1.2.1. Thrombozyten und Gefäßwand

Thrombozyten, die sich im Blutstrom befinden, lagern sich normalerweise nicht an die Gefäßwand an. Durch verschiedene Stimuli, z.B. aufgrund einer Endothelverletzung mit Freilegung von Kollagenfibrillen, kann es zu einer Aktivierung der Blutplättchen kommen, die über verschiedene biochemische und morphologische Veränderungen eine Aggregation nach sich zieht. Für die Aggregation gilt generell die Hypothese der "Grundreaktion der Plättchen" (basic platelet reaction), (55):

Nach der Interaktion einer aggregationsauslösenden Substanz mit einem Membranrezeptor kommt es zur Freisetzung eines entsprechenden "second messenger" aus der Membran in das Zytoplasma.

Nach Überschreiten einer gewissen Schwellenkonzentration kann es zu verschiedenen, voneinander unabhängigen Reaktionen des Thrombozyten kommen:

- Durch Stimulierung kontraktiler Proteine morphologische Veränderung mit Pseudopodienbildung (shape change). Diese ist ein Indikator für die Aktivierung der Plättchen (109).
- Adhäsion, d.h. Anheftung von Thrombozyten an eine Oberfläche, wobei es u.a. durch ADP-Freisetzung zur Anlagerung weiterer Thrombozyten und fließendem Übergang zur Aggregation kommt.
- Freisetzungsreaktion (release reaction): Hierbei werden verschiedene Substanzen abgegeben, u.a. solche, die während der Plättchenaktivierung produziert wurden. Zu dieser Gruppe gehören die aus dem Arachidonsäure-Metabolismus stammenden Prostaglandine und Thromboxan A_2 , die gesondert abgehandelt werden(s. 2.2.).

Andererseits stammen die freigesetzten Substanzen aus verschiedenen Granula der Thrombozyten.

Die α -Granula enthalten z.B. Fibrinogen, "platelet derived growth factor", der die Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten stimuliert, Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin und Thrombozyten-spezifische Proteine. In den elektronendichten δ -Granula (dense granules) ist ADP, Serotonin und der überwiegende Teil des thrombozytären Kalziums enthalten. In den λ -Granula lagern lysosomale Enzyme.

Weiterhin werden Kollagenasen und verschiedene Gerinnungsfaktoren, z.B. Faktor V und VIII, über ein Kanalsystem, das sich bis zur Oberfläche erstreckt, ausgeschleust (s. Abb. 1).

Durch bestimmte aggregationsinduzierende Substanzen erfolgt die Sekretion unabhängig von der Aggregation, z.B. Kollagen.

Durch andere, z.B. ADP, kommt es zu einer aggregationsabhängigen Sekretion, die kurz nach Aggregationsbeginn einsetzt.

Allen genannten Vorgängen ist die Vermittlung durch einen "second messenger" gemeinsam. Bei diesem dürfte es sich um Kalzium handeln, das damit die gemeinsame Endstrecke für die Aktivierung der Thrombozyten durch aggregationsauslösende Substanzen darstellt. (143).

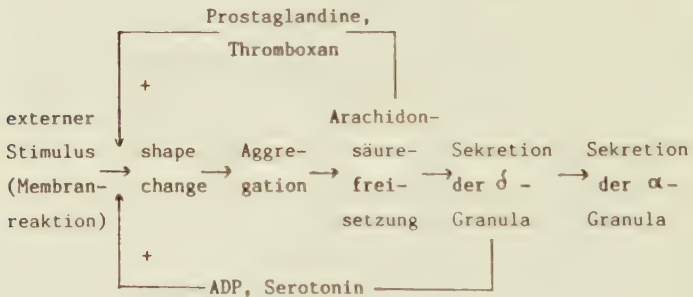


Abb. 1: Die Grundreaktion der Thrombozyten (basic platelet reaction), nach 55

1.2.2. Das Prostaglandin- Thromboxan- System

1.2.2.1. Physiologie der Prostaglandine

Als v. Euler 1935 aus menschlicher Samenflüssigkeit eine Substanz isolierte, die nicht-vaskuläre, glatte Muskulatur kontrahierte und blutdrucksenkend wirkte, nannte er sie - in der falschen Annahme, daß sie in der Prostata gebildet werde - Prostaglandin. Heute ist bekannt, daß Prostaglandine ubiquitär vorkommen und je nach untersuchtem Organismus, Organsystem oder Art des Prostaglandins eine große Anzahl

von Wirkungen haben. Prostaglandine werden nicht gespeichert, sondern auf Reize hin synthetisiert und sofort sezerniert. Ihre Inaktivierung erfolgt innerhalb von Sekunden bis Minuten, vor allem bei der Passage durch die Lunge (41,93).

Die Grundstruktur enthält 20 Kohlenstoffatome und wird durch einen Cyclopentanring stabilisiert (s. Abb. 2).

Hauptvorläufer der Prostaglandine sind ungesättigte Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen, die als Phospholipide in allen Zellmembranen vorkommen, vor allem die Arachidonsäure.

Diese wird durch Phospholipasen freigesetzt und schnell metabolisiert, entweder durch den Lipoxygenase-Stoffwechselweg oder die Cyclooxygenase.

Diese wandelt die Arachidonsäure in die cyclischen Endoperoxide Prostaglandin G_2 und H_2 (PGG_2 , PGH_2), labile Intermediärprodukte (Halbwertszeit ca. 5 Min.) mit hoher biologischer Aktivität, um (50,51). PGG_2 und PGH_2 , die vasokonstriktorisch und aggregationsfördernd wirken, sind Vorläufer einiger z.T. antagonistisch wirkender Produkte. Durch die Thromboxan-Synthetase, die Needleman in Thrombozyten-Mikrosomen identifizieren konnte (98), entsteht Thromboxan A_2 , das mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden noch instabiler und stärker vasokonstriktorisch wirksam ist als die Endoperoxide. Thromboxan A_2 (TxA_2) wird spontan in das stabilere Thromboxan B_2 (TxB_2) degradiert, das die Aggregation und den Vasotonus nur wenig beeinflusst.

Durch die Prostacyclinsynthetase kann aus PGG_2 und PGH_2 Prostacyclin (PGI_2), das eine labile Ätherkonfiguration enthält und mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Minuten zu Prostaglandin $F_{1\alpha}$ ($PGF_{1\alpha}$) zerfällt, gebildet werden. PGI_2 wirkt sehr stark aggregationshemmend und vasodilatatorisch (103).

Weiterhin können durch spontane oder enzymatische Umwandlung die klassischen Prostaglandine F_2 (PGF_2), D_2 (PGD_2) und E_2 (PGE_2) entstehen.

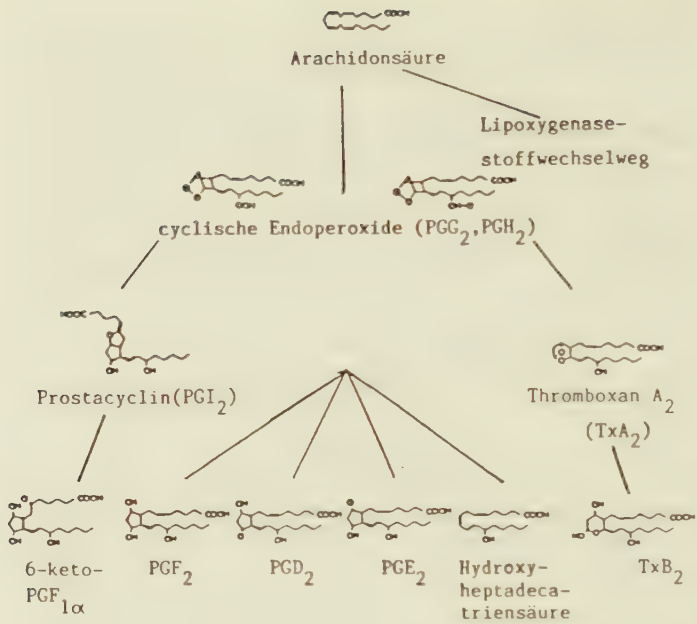


Abb. 2: Arachidonsäure - Metabolismus (1=Cyclooxygenase, 2=Prostacyclinsynthetase, 3=Thromboxansynthetase), nach 94

1.2.2.2. Der thrombozytäre und endotheliale Prostaglandin-metabolismus

Die Identifizierung verschiedener Prostaglandin-Metaboliten ermöglichte ein besseres Verständnis der physiologischen Vorgänge bei der Aggregation.

In Thrombozyten werden bei Stimulierung, z.B. Besetzung der Membranrezeptoren durch Kollagen, Prostaglandine und ihre Folgeprodukte synthetisiert und sezerniert.

Dabei wird durch die Phospholipase A_2 , die Ca^{++} als Cofaktor

benötigt, Arachidonsäure nur aus Phosphatidylcholin, -serin und -ethanolamin freigesetzt. Die Phospholipase C, die weniger Ca^{++} benötigt, katalysiert die Synthese von Arachidonsäure aus Phosphatidylinositol (137).

Das entscheidende und in Thrombozyten fast ausschließlich entstehende Produkt nach Arachidonsäure-Freisetzung und Bildung der cyclischen Endoperoxide ist TxA_2 .

Der Wirkungsmechanismus des TxA_2 und dessen Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und Freisetzungsreaktion ist nach wie vor nicht genau geklärt. Die Aktivität der Cyclooxygenase und Thromboxansynthetase ist vor allem, wenn nicht sogar ausschließlich, an den intrazellulären Membranen lokalisiert (25). Nachdem sich vermutlich dort auch die Hauptlager für intrazelluläres Ca^{++} befinden, wurden den cyclischen Endoperoxiden und vor allem TxA_2 eine Mediatorrolle bei der Freisetzung des intrazellulären Ca^{++} aus dem dichten tubulären System (DTS) zugeschrieben. Gerrard (47) postulierte dabei, daß sie direkt als Ionophoren des Ca^{++} aus dem DTS ins Zytoplasma wirken könnten.

Dem Ca^{++} -Anstieg folgt eine Aktivierung kontraktile Proteine und Fusion von Membranen der Granula und der Oberfläche mit konsekutiver Granulaentleerung.

Andererseits spielt cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bei der Regulation des intrazellulären Ca^{++} -Flusses eine große Rolle, da die Wiederaufnahme von Ca^{++} in das DTS cAMP-abhängig ist. Daher hemmt ein hoher cAMP-Spiegel die Aggregation, ein niedriger begünstigt sie (137).

Außerdem kann cAMP durch Inaktivierung einer Myosinkinase in den Stoffwechsel der kontraktile Proteine eingreifen und die Kontraktilität bzw. Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten herabsetzen (129).

Auch in den Zellen der Gefäßintima wird die Arachidonsäure metabolisiert. Analog den Vorgängen in Thrombozyten entstehen cyclische Endoperoxide, die dann allerdings überwiegend durch die Prostacyclinsynthetase zu PGI_2 transformiert werden.

Vermutlich können Endothelzellen auch exogene, z.B. von Thrombozyten stammende, Endoperoxide utilisieren. Allerdings wird die Frage, ob überhaupt, oder unter welchen Umständen dies der Fall ist, kontrovers diskutiert (56,85,100).

Die im Gegensatz zu TxA_2 stark aggregationshemmende Wirkung des PGI_2 wird darauf zurückgeführt, daß es über eine Stimulierung der Thrombozyten-Adenylatcyclase zu einer cAMP-Anhäufung führt (48), ein Mechanismus, über den auch die normalerweise weniger bedeutenden PGD_2 und PGE_1 wirken.

Durch den cAMP-Anstieg wird vermutlich eine Freisetzung von Membranphospholipiden verhindert (77).

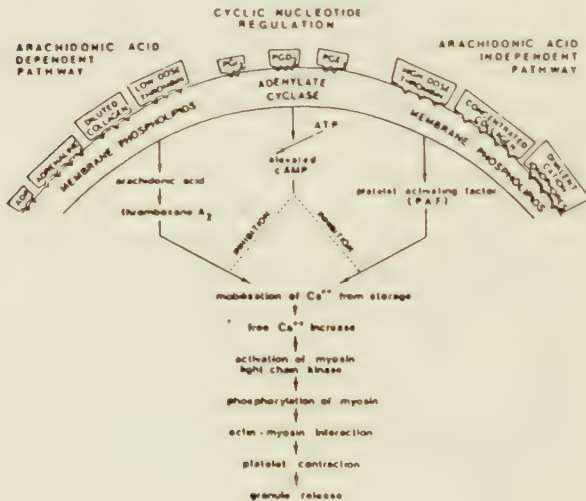


Abb. 3: Einflüsse auf die Ca^{++} -Mobilisierung in Thrombozyten (nach 137).

Die Thrombozytenaggregation läßt sich daher als ein System verstehen, das durch ein Gleichgewicht von aggregationsfördernden Substanzen, cyclischen Endoperoxiden und vor allem TxA_2 , verbunden mit einer Stimulation der Ca^{++} -Mobilisierung und erniedrigtem cAMP-Spiegel einerseits, und aggregationshemmenden Agenzien, hauptsächlich PGI_2 , verbunden mit einer Hemmung der Ca^{++} -Mobilisierung und einer Erhöhung des cAMP-Spiegels andererseits, moduliert wird (90).

1.2.2.3. Pathophysiologische Bedeutung des Prostaglandinstoffwechsels in Thrombozyten und Endothelzellen

Während die cyclischen Endoperoxide bzw. TxA_2 für die Förderung von Aggregationsvorgängen, die physiologischerweise einen Reparaturvorgang darstellen, wichtig sind, stellt die PGI_2 -Produktion einen Schutzmechanismus der Gefäßwand vor überschießender Aggregat- und Thrombusbildung dar.

Ein Ungleichgewicht zwischen diesen Substanzen könnte für den Organismus katastrophale Folgen haben.

Ein gestörtes Verhältnis $\text{PGG}_2/\text{PGH}_2$ und TxA_2 zu PGI_2 wird bei vielen Krankheitsbildern diskutiert:

Eine verminderte PGI_2 -Produktion mit konsekutiv vermehrter Aggregabilität und deren Folgen wie Thrombose und Embolie (17) liegt z.B. im Bereich arteriosklerotischer Gefäßveränderungen, bei denen das Endothel geschädigt ist und Kollagenfibrillen freiliegen, vor.

Im Rahmen kardialer ischämischer Erkrankungen angestellte Untersuchungen legen eine pathogenetische Wirkung von PGG_2 , PGH_2 , TxA_2 und PGI_2 nahe (7,54,75,88).

Auch die Thrombogenität von ersetzten Herzklappen oder Gefäßprothesen läßt sich durch lokal fehlende PGI_2 -Bildung gut erklären. Hochsignifikante Unterschiede zwischen den

Thromboxan-Spiegeln von Patienten mit Herzklappenersatz und Kontrollen konnten nachgewiesen werden (28).

Bei den Gefäßkomplikationen des Diabetes mellitus wird die ursächliche Beteiligung eines gestörten TxA_2 - PGI_2 -Verhältnisses vermutet. So wurde bei Diabetikern eine vermehrte Thromboxan-Produktion und eine verminderte PGI_2 -Produktion belegt (23,38,126).

Ebenso wird in neuerer Zeit ein Mißverhältnis zwischen TxA_2 und PGI_2 im Rahmen des septischen Schocks als wesentlich angesehen (24,104).

Weiterhin wird die Möglichkeit einer Dysregulation in der Interaktion der beiden antagonistischen Metabolite der cyclischen Endoperoxide als ein möglicher Vorgang bei der Genese der essentiellen Hypertonie, deren wichtigste Folgeerkrankung die Arteriosklerose ist, zunehmend als wahrscheinlich angenommen (139). Auch bei Patienten mit essentieller Hypertonie konnte gegenüber Kontrollpersonen ein signifikant erhöhter Thromboxan-Spiegel festgestellt werden (57).

Diese Beispiele zur Bedeutung der Physiologie und Pathophysiologie hämostatischer Mechanismen und speziell des Arachidonsäure-Metabolismus legen die Suche nach Möglichkeiten pharmakologischer und therapeutischer Einflußnahme nahe.

1.2.3. Das plasmatische Gerinnungssystem

Parallel zur Thrombozytenaggregation kommt es zu einer Aktivierung der Faktoren des plasmatischen Gerinnungssystems. Das hierzu 1905 von Morawitz erstellte Schema (95) besitzt nach wie vor, wenn auch wesentlich erweitert, Gültigkeit. Zwei Systeme werden unterschieden:

Das exogene System wird durch das nicht aus dem Blut, sondern aus verletzten Gewebszellen stammende Gewebsthromboplastin aktiviert. Dieses führt über die Aktivierung weiterer Faktoren innerhalb von Sekunden zur Bildung von

Gewebsthrombokinase, die Prothrombin in Thrombin umwandelt. Der Reaktionsablauf des endogenen Systems wird z.B. durch den aus Thrombozyten stammenden Plättchenfaktor 3, ein Membranphospholipid, oder durch Kollagen in Gang gesetzt. Faktor XII wird aktiviert und über die Kaskade des endogenen Systems innerhalb von Minuten Blutthrombokinase gebildet. Diese führt zur Entstehung von Thrombin. Dadurch wird eine Fortsetzung der Aggregation, die Freisetzung von Substanzen wie z.B. Nukleotiden und die Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus bewirkt sowie Fibrinogen in Fibrin umgewandelt und damit das noch reversible Thrombozytenaggregat konsolidiert (84,106). Fibrin stabilisiert den Thrombozytenpfropf, der durch die Einwirkung von ATP, Faktor XIII und Thrombosthenin zum retrahierten Gerinnsel wird.

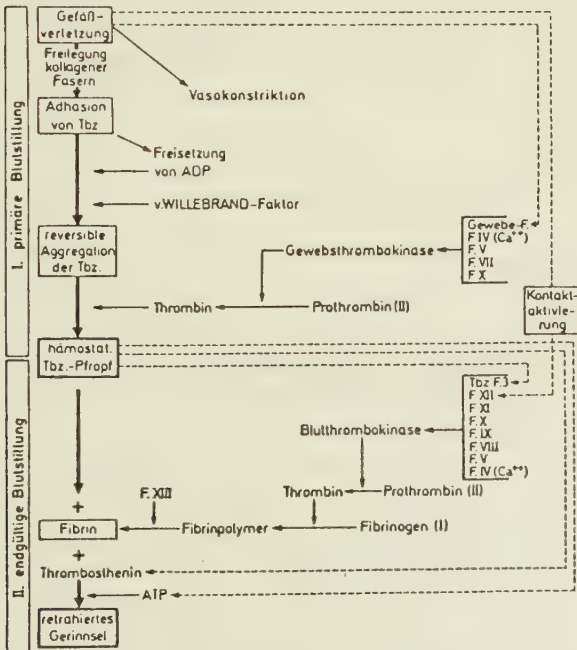


Abb. 4: Schema der Blutstillung (nach 78)

1.3. Eingriffsmöglichkeiten in Hämostase und Prostaglandin-stoffwechsel

Bei Hämostasestörungen, die mit einer erhöhten Thrombose-neigung einhergehen, hat sich eine Behandlung mit Antikoagu-lantien, vor allem mit Heparin und Vitamin K-Antagonisten, durchgesetzt. Dabei wird auf die Therapie und Prophylaxe thrombotischer Prozesse abgezielt, die sich im langsam fließenden venösen Blut abspielen. Weniger überzeugend sind dagegen positive Effekte im arteriellen Bereich, der eine hohe Flußrate hat und in dem thrombembolische Komplikationen weniger durch plasmatische Hyperkoagulabilität als durch die Aktivierung von Thrombozyten ausgelöst werden. So ist z.B. die orale Antikoagulantientherapie zur Rezidivprophylaxe nach Myokardinfarkt seit 20 Jahren umstritten. Dies hat verstärkt die Suche nach Möglichkeiten einer direkten Beeinflussung der Thrombozyten ausgelöst (18,105,121).

Derartige Modulationen sind - zumindest theoretisch - auf verschiedenen Stufen des thrombozytären Stoffwechsels möglich:

- Einerseits kann versucht werden, durch direkten Angriff an der Membran Rezeptoren für proaggregatorische Agenzien auszuschalten (z.B. durch Coating mit Penicillinen oder Dextranen).

- Außerdem ist es möglich, regulierend auf den cAMP-Spiegel einzuwirken. Durch Stimulierung der Adenylatcyclase kann z.B. die Bildung von cAMP gefördert, durch Hemmung der Phosphodiesterase der Abbau gehemmt werden.

- Weiterhin hat das Verständnis des Arachidonsäure-Metabo-lismus die Hoffnung geweckt, durch modulierende Eingriffe in dieses System die Thrombozytenfunktion regulieren zu können. Dazu bestehen folgende Möglichkeiten: Erstens kann eine Hemmung der Bildung der cyclischen Endoperoxide bzw. vor allem von TxA_2 , zweitens eine direkte Blockade von TxA_2 -Rezeptoren durch spezifische Antagonisten versucht werden. Drittens wäre eine Stimulierung der PGI_2 -Synthese

oder die Verwendung von PGI_2 -Analoga denkbar.

1.4. Ziel der Arbeit

Störungen der Hämostase können für den Betroffenen schicksalhafte Bedeutung gewinnen.

Durch Eingriffe in die Thrombozytenfunktion wird versucht, bei epidemiologisch bedeutsamen Erkrankungen des Herzkreislaufsystems prophylaktisch und therapeutisch einzugreifen.

Ziel dieser Arbeit ist es, Aufschlüsse über die Wechselwirkung zwischen der Beeinflussung des Thrombozyten, speziell des Arachidonsäure-Stoffwechsels auf verschiedenen Stufen und der Modulation der Aggregation durch inhibierende Substanzen zu gewinnen.

Zunächst wurden daher Versuchsreihen in vitro unter standardisierten Bedingungen im plättchenreichen Plasma durchgeführt, wobei die Aggregation durch Kollagen, ADP, Arachidonidonsäure und Ristocetin ausgelöst wurde. Zur Modulation standen ein irreversibler Hemmstoff der Cyclooxygenase (ASS), zwei reversible Cyclooxygenasehemmer (Indomethacin, Piroxicam), zwei Thromboxansynthetase-Inhibitoren (UK 37.248, UK 38.485), ein Thromboxanantagonist (BM 13.177) und Bezafibrat, ein "Lipidsenker", der die Thrombozytenfunktion beeinflusst und dessen genauer Wirkmechanismus noch unerklärt ist, zur Verfügung. Die Wirkung der Substanzen, im folgenden als "Inhibitoren" bezeichnet, wurde dabei in verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Weiterhin sollen in der Arbeit analog zu den Aggregationsreihen im plättchenreichen Plasma vergleichende Untersuchungen im Vollblut durchgeführt werden. Dies ist möglich, da seit kurzem Geräte zur Vollblutaggregometrie verfügbar sind.

Dazu wurden die Versuchsreihen mit den gleichen Inhibitoren und Kollagen, ADP und Arachidonsäure als aggregationsinduzierende Substanzen durchgeführt. Die Gegenüberstellung

von Ergebnissen im plättchenreichen Plasma und Vollblut könnte wichtige Hinweise auf die im natürlicheren Milieu Vollblut vorliegenden veränderten Verhältnisse geben. So könnte z.B. von Monozyten produziertes PGI_2 (13), von Erythrozyten freigesetztes ADP oder von Leukozyten stammender Plättchen-aktivierender Faktor (PAF, 5,45) das Aggregationsverhalten der Thrombozyten modulieren.

In einem dritten Abschnitt wird versucht, die Einflüsse der Inhibitoren quantitativ zu erfassen und eine Beziehung zum Aggregationsverhalten zu erkennen. Dazu wurde in Gegenwart eines Inhibitors nach Aggregationsauslösung durch Kollagen der zeitliche Verlauf der Thromboxanfreisetzung radioimmunologisch gemessen. Die ermittelten Werte wurden mit den Ergebnissen der Aggregationsreihen in Beziehung gesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

2.1.1. Die aggregationsinduzierenden Substanzen

2.1.1.1. Kollagen

Es wurde das Kollagenreagenz Horm^R der Firma Hormon-Chemie, München, verwendet. Die Ausgangslösung mit 1 mg Kollagenfibrillen in 1 ml isotoner Glucoselösung wurde mit dem dazugehörigen Puffer in zwei Schritten 1:20 bzw. 1:40 verdünnt, wodurch eine Endkonzentration von 0,05 bzw. 0,025 mg/ml vorlag. Diese Lösung wurde täglich neu angesetzt und für die Aggregation im plättchenreichen Plasma wie auch im Vollblut benutzt. Die endgültige Konzentration in der Probe betrug im PRP und im Vollblut 1 µg/ml.

2.1.1.2. ADP

Adenosin-5-Phosphat-Dinatriumsalz (MG 471,2) stammte von Boehringer, Mannheim. 50 mg wurden in 50 ml 0,9 %igem NaCl gelöst und in Portionen von 1 ml als Stammlösung bei -40° C eingefroren. Jeweils am Versuchstag wurde 1 ml der Stammlösung aufgetaut und mit 0,9 %igem NaCl 1:20 bzw. 1:40 verdünnt, woraus sich wiederum eine Konzentration von 0,05 bzw. 0,025 mg/ml ergab. Auch diese Lösung wurde für die Aggregation im plättchenreichen Plasma und Vollblut benutzt, wobei die Endkonzentration im PRP 1 µg/ml, im Vollblut 1-5 µg/ml betrug.

2.1.1.3. Arachidonsäure

Arachidonsäure (MG 304,5), 5,8,11,14-Eicosatetraensäure, C₂₀H₃₂O₂, stammte von Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

2.1.1.3.1. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma

Zunächst wurde Trispuffer mit pH 7,7 bei Raumtemperatur hergestellt, der im Kühlschrank bei 4° C bis zu 6 Wochen gelagert wurde. Dann wurde Natriumcarbonat in Aqua dest. gelöst, so daß sich eine 0,1 molare Lösung ergab. Als Lösungsmittel für die Arachidonsäure wurden 5 ml dieser Natriumcarbonatlösung mit 1 ml Ethanol (reinst) jeweils neu angesetzt und eisgekühlt.

Für die Herstellung der Arachidonsäure-Stammlösung wurde die Ampulle geöffnet und 1 ml eiskaltes Lösungsmittel hinzugegeben. Nach Parafilmverschluß war die Stammlösung vorbereitet. Sie wurde bei -40° C gelagert.

Das Ansetzen der Arbeitslösung erfolgte durch Zugabe 1 ml eiskalten Trispuffers zu 0,25 ml Stammlösung, woraus sich eine Endkonzentration der Arbeitslösung von 32,8 mM ergab. Mit einer Endkonzentration in der Probe von 400 µg/ml im PRP ließ sich eine gut reproduzierbare Aggregation auslösen.

2.1.1.3.2. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut

Für die Aggregation im Vollblut wurde folgendermaßen vorgegangen : Eine Ampulle mit 50 mg Arachidonsäure wurde unter Stickstoffatmosphäre geöffnet und in 1 ml eiskaltem, 100 %igem Ethanol, das N₂-begast worden war, gelöst. Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, unter N₂-Atmosphäre verschlossen und bei -40° C als Lagerlösung aufbewahrt.

Vor der Aggregationsmessung wurden dieser Lagerlösung 0,1 ml entnommen und zu 0,9 ml plättchenfreiem Plasma des Probanden pipettiert. Dies ergab die zur Vollblutaggregation verwendete Arachidonsäurelösung mit einer Endkonzentration von mit einer Endkonzentration von 16,4 mM. Nach Zugabe zum Probenvolumen betrug die Arachidonsäurekonzentration 350 µg/ml.

2.1.1.4. Ristocetin

Ristocetin wurde als lyophilisiertes Ristocetinsulfat von der Firma Lundbeck, Kopenhagen, Dänemark, geliefert. 100 mg Ristocetin wurden durch Zugabe von 3,3 ml 0,9 %igem NaCl in Lösung gebracht und bei $+2^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es ergab sich eine Konzentration von 30,3 mg/ml. Nach Zugabe zur Probe lag Ristocetin in einer Konzentration von 600 $\mu\text{g/ml}$ vor.

Alle aggregationsauslösenden Substanzen wurden nach dem Ansetzen im Eisbad gelagert.

2.1.2. Auf aggregationshemmende Wirkung untersuchte Substanzen

Alle auf inhibitorische Wirkung untersuchten Substanzen wurden in 0,1 molarem Trispuffer gelöst (Tris-HCl und Tris-Base waren von Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA). Der pH-Wert wurde auf 8,0 bei 25°C , entsprechend 7,7 bei 37°C eingestellt. Die Pufferlösung wurde bis zu vier Wochen bei $+2^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Alle Inhibitoren standen als Trockensubstanz zur Verfügung. Nach Abwiegen (Fehlergrenze der Waage: 0,05 mg) wurden sie in Puffer gelöst und durch fortgesetzte Verdünnung verschiedene Konzentrationen hergestellt. Alle gelösten Testsubstanzen wurden höchstens vier Tage gelagert mit Ausnahme von Acetylsalicylsäure, die für die Versuchsreihen täglich neu in Lösung gebracht wurde.

2.1.2.1. Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS (MG 176), kristallin, wurde von Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA, geliefert. Durch Zugabe der Trockensubstanz zur Pufferlösung wurden Konzentrationen von $2 \times 10^{-3}\text{ M}$ bis 10^{-5} M erreicht.

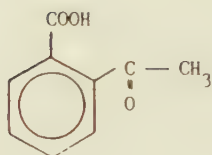


Abb. 5: Strukturformel von ASS

2.1.2.2. Indomethacin

Indomethacin, 1-(p-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl-essigsäure (MG 357,5), war von Sharp und Dohme GmbH, München. In den Verdünnungen lag Indomethacin in Konzentrationen zwischen 10^{-2} M und 10^{-5} M vor.

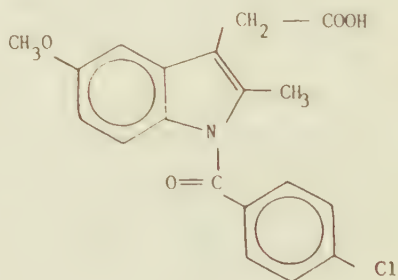


Abb. 6: Strukturformel
von Indomethacin

2.1.2.3. Piroxicam

Piroxicam, [4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxamid 1,1-dioxid] wurde von der Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen, bezogen. Piroxicam (MG 331,1) lag gelöst in Konzentrationen zwischen 5×10^{-3} M und 10^{-5} M vor.

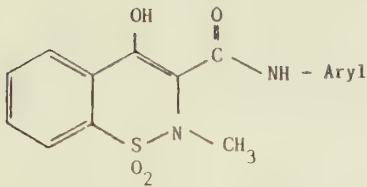


Abb. 7: Strukturformel von Piroxicam

2.1.2.4. UK 37,248

UK 37,248, 4-[2-(1-H imdazol-1-yl)ethoxy] benzoessäure (MG 232,5), ein Versuchspräparat, wurde von Pfizer Limited, Sandwich, England, zur Verfügung gestellt. Es wurden Konzentrationen von 10^{-2} M bis 10^{-5} M angesetzt.

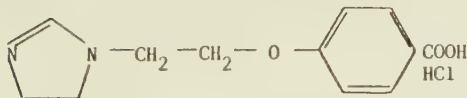


Abb.8: Strukturformel von UK 37,248

2.1.2.5. UK 38,485

UK 38,485, 3-(1-H-imidazol-1-ylmethyl)-2-methyl-1H-indol-1-propansäure (MG 283,3), eine Weiterentwicklung von UK 37,248, wurde ebenfalls von Pfizer Limited, Sandwich, England, zur Verfügung gestellt. Es wurden Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-2} M und 10^{-5} M hergestellt.

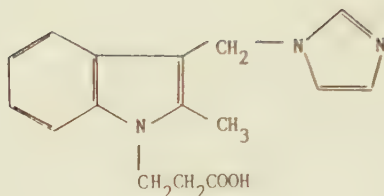


Abb. 9: Strukturformel von UK 38,485

2.1.2.6. BM 13.177

BM 13.177, 4-[2-(benzensulfonamido)-ethyl] phenoxyacetsäure (MG 335,4), ein Versuchspräparat, wurde von der Firma Boehringer, Mannheim, geliefert, und wurde in Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 5×10^{-6} M in Lösung gebracht.

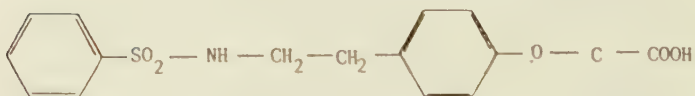


Abb. 10: Strukturformel von BM 13.177

2.1.2.7. Bezafibrat

Bezafibrat, 2-[4-(4-Chlorbenzamido)ethyl phenoxy]-2-methylpropionsäure (MG 362,6), war ebenfalls von Boehringer, Mannheim. Es wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 10^{-2} M und 10^{-5} M hergestellt.

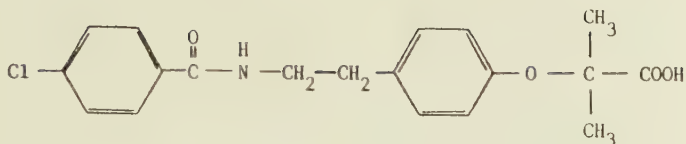


Abb. 11: Strukturformel von Bezafibrat

2.1.3. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge

2.1.3.1. Herstellung der Lösung zur Reaktionsbeendigung

Zunächst wurden zur Herstellung eines Isogel-Trispuffers 6,05 g Tris-HCl und 40,8 g NaCl in 350 ml Aqua dest. gelöst und 3,3 ml HCl (konzentriert) zugegeben. Dann wurde der pH-Wert mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

Zu 100 ml dieser Lösung wurden zunächst 250 ml Aqua dest. gegeben und anschließend 1 g Gelatine (Gelatine Typ III, Calfskin, von Sigma Chem., St. Louis, USA) darin gelöst. Dann wurde ebenfalls mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Dieser Puffer diente im weiteren auch als Grundlage der später aufgeführten Agenzien für den Radioimmunoassay. Sodann wurde Indomethacin abgewogen und im 10 ml Puffer gelöst, so daß sich eine Konzentration von 10^{-2} M ergab.

2.1.3.2. Reagenzien zur radioimmunologischen Thromboxanbestimmung

Normales Kaninchenserum (normal rabbit serum, NRS) stammte von der Firma Miles, Frankfurt/M., und wurde 1:20 000 verdünnt.

Standard-Thromboxan B_2 (TxB_2), $1 \mu g/ml$, chemisch synthetisiert, war von Sigma Chem., St. Louis, USA, und wurde auf Konzentrationen zwischen $12,5 \text{ pg/ml}$ und 400 pg/ml verdünnt. [3H]- TxB_2 wurde von New England Nuclear, Boston, USA, geliefert und hatte eine spezifische Aktivität von 150 Ci/mMol . Anti- TxB_2 -Plasma vom Kaninchen (Immuno rabbit plasma, IRP) wurde dankenswerter Weise von Prof. Levine, Boston, USA, zur Verfügung gestellt.

Für das zweite Antikörpersystem wurden Kaninchen-IgG ($60 \mu g/ml$), lyophilisiert, von Sigma Chem., St. Louis, sowie das von der Ziege gewonnene Anti-Kaninchen-Plasma (goat-anti-rabbit-plasma, GARP), lyophilisiert, von Miles, Frankfurt/M., verwendet.

Die Szintillationsflüssigkeit (Riafluor-Scintillator) stammte von New England Nuclear, Boston.

2.2. Messung der Aggregation im plättchenreichen Plasma

Alle Versuche wurden an zwei gesunden, 33- bzw. 23jährigen männlichen Probanden durchgeführt. Beide hatten seit mindestens vier Wochen vor der Blutentnahme keine Medikamente zu sich genommen. Die Blutentnahme wurde in nüchternem Zustand durchgeführt, d.h. die letzte Nahrungsaufnahme lag mindestens 7 Stunden zurück.

2.2.1. Thrombozytenaufbereitung

2.2.1.1. Gewinnung von plättchenreichem Plasma

Nach Aufziehen von 3,8 %igem Na-Citrat in eine Polypropylen-spritze (Kanüle Nr. 1) erfolgte die Blutentnahme aus einer Kubitalvene (Verhältnis Na-Citrat : Blut 1:10). Das Blut wurde kontinuierlich und langsam entnommen. Dann wurde durch

vorsichtiges Wenden der Spritze das Blut mit dem Antikoagulanzen vermischt und in Plastikreagenzröhrchen umgefüllt. Diese wurden bei Raumtemperatur mit 80 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Eppendorf-Pipette in ein Reagenzglas abpipettiert und ergab das vorläufige plättchenreiche Plasma. Zur Ermittlung der Thrombozytenzahl/ μ l wurde in eine Leukozytenpipette das vorläufige plättchenreiche Plasma bis zur Marke 0,5 aufgezo-gen und dann mit Procainhydroxid (2 %ig) bis zur Marke 11 ergänzt.

Nach einminütigem Mischen im Rüttler wurden die ersten drei Tropfen verworfen und dann eine Neubauer-Zählkammer beschickt, die 12 Minuten in einer feuchten Kammer zur Thrombozytensedimentation belassen wurde. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung. Multiplikation mit dem Faktor 1100 ergab die Thrombozytenzahl/ μ l im vorläufigen plättchenreichen Plasma.

2.2.1.2. Gewinnung von plättchenarmem Plasma

Sofort nach Abpipettieren des vorläufigen plättchenreichen Plasmas wurde das in den Reagenzgläsern verbliebene Blut nochmals bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 1500 g zentrifugiert. Der hieraus abpipettierte Überstand ergab das plättchenarme Plasma (platelet poor plasma, PPP).

2.2.1.3. Herstellung von standardisiertem plättchenreichem Plasma

Zur Standardisierung der Versuche sollten alle Aggregationen in Plasma mit einer Thrombozytenkonzentration von 200 000/ μ l durchgeführt werden. Es wurde daher nach Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im vorläufigen plättchenreichen Plasma der entsprechende Verdünnungsfaktor ermittelt und das

PPP zur Verdünnung auf die gewünschte Konzentration verwendet. Dieses standardisierte, auf 200 000 Thrombozyten/ μ l eingestellte Plasma wird im weiteren als PRP (platelet rich plasma) bezeichnet.

2.2.2. Durchführung der Aggregationsmessung im PRP

2.2.2.1. Geräte

Es wurde ein Aggregometer der Firma Labor , Hamburg, verwendet, bei dem jeweils unabhängig voneinander zwei Rundküvetten mit je 500 μ l PRP in einen Strahlengang gebracht werden konnten. Durch Photozellen wurde die jeweilige Lichttransmission registriert. Je nach Ausmaß der Aggregation kam es zu einer mehr oder weniger starken Zunahme der Transmission, die durch einen Schreiber festgehalten wurde. Es handelte sich um einen BD 41 Recorder der Firma Kipp und Zonen, Holland. In allen Versuchen betrug die Rührgeschwindigkeit 1200 rpm, die Spreizung 50 mV und der Papiervorschub 30 mm/Minute. Durch Einschalten des Aggregometers ca. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurde eine Temperatur von 37° C erreicht, die während der Versuchsreihen konstant gehalten wurde.

2.2.2.2. Ablauf des Aggregationsversuchs

Nach vorsichtigem Wenden des Reagenzglases wurden je 500 μ l PRP zur Bestimmung der Aggregation in eine Rundküvette pipettiert. Nachdem ein Magnetrührer in die Küvette eingebracht war, wurden 20 μ l Puffer für die Leerwertbestimmung

bzw. 20 μ l Inhibitorlösung hinzupipettiert und die Proben bei 37° C bei einer Rührgeschwindigkeit von 1200 rpm inkubiert.

Unterdessen wurde entsprechend der Methode nach Born (14,15) eine Küvette mit PPP zur Eichung des Aggregometers in den Strahlengang gebracht und nach Drücken des "Start"-Knopfes eine Transmission von 90 % am Schreiber eingestellt. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde die Probe mit PRP aus dem Fibrintimer genommen, in den Strahlengang gebracht und mit der Kalibrierung am Aggregometer die am Schreiber angezeigte Transmission auf 10 % eingestellt. Genau 180 Sekunden nach Puffer- bzw. Inhibitorzugabe wurde nun mit einer Eppendorf-Pipette die aggregationsauslösende Substanz zugegeben, wobei es im Laufe der Aggregation durch die Entstehung größerer Thrombozytenaggregate und Volumenverlust der Einzelthrombozyten zum Anstieg der Lichttransmission kam, die am Schreiber kontinuierlich festgehalten wurde.

Alle Aggregationsteste wurden zwischen der 35. und 90. Minute nach Blutentnahme durchgeführt.

2.2.2.3. Typische Aggregationskurven ohne Inhibitor und Auswertungskriterien

2.2.2.3.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation

Es wurde die Reaktionszeit t_0 (lag phase) vom Zeitpunkt der Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz bis zum Einsetzen der Aggregation gemessen, d.h. bis zum Beginn der Transmissionszunahme mit Abweichung des Schreibers von der Ausgangslinie.

Weiterhin wurde der Tangens des Winkels α bestimmt, den die im steilsten Punkt der Kurve angelegte Tangente mit der Waagrechten bildete als Maß für die maximale Geschwindigkeit der Transmissionszunahme bzw. Aggregation.

Außerdem wurde der Abstand der maximalen Amplitude der

Aggregationskurve von der Grundlinie gemessen. Diese Amplitude wurde bei der Aggregation ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt und eine durch Anwesenheit eines Inhibitors bedingte Hemmung, d.h. Verkleinerung der Amplitude, auf diesen Wert bezogen, wobei galt:

$$\text{Aggregation(\%)} = \frac{\text{Kurvenamplitude in Gegenwart eines Inhibitors}}{\text{Kurvenamplitude ohne Inhibitor (Leerwert)}} \times 100$$

Außerdem wurde die Zeit $T_{\tan}$ bestimmt, die von der Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz bis zum Schnittpunkt der im Punkt größter Steigung angelegten Tangente mit der Nulllinie verging.

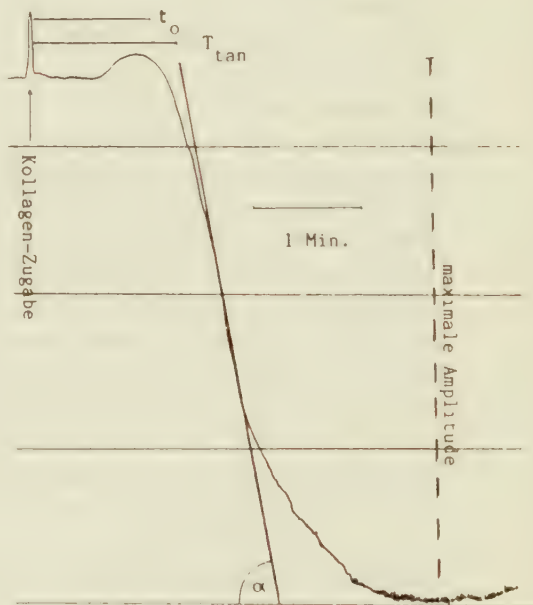


Abb. 12:
Kollagen-
induzierte
Aggregation

2.2.2.3.2. Die ADP-induzierte Aggregation

Analog dem Vorgehen bei Kollagen wurde die Reaktionszeit t_0 , der Tangens des Winkels α sowie das Verhältnis der Amplituden der Aggregationskurven als Maß für die prozentuale Hemmung der Aggregation ermittelt. In Vorversuchen bezüglich des Einflusses des Zeitintervalls zwischen Blutentnahme und

Durchführung des Aggregationstests konnte gesichert werden, daß das Aggregationsverhalten der Thrombozyten im gewählten Zeitraum unter sonst gleichen Bedingungen im PRP wie im Vollblut nicht erkennbar beeinflusst wurde.

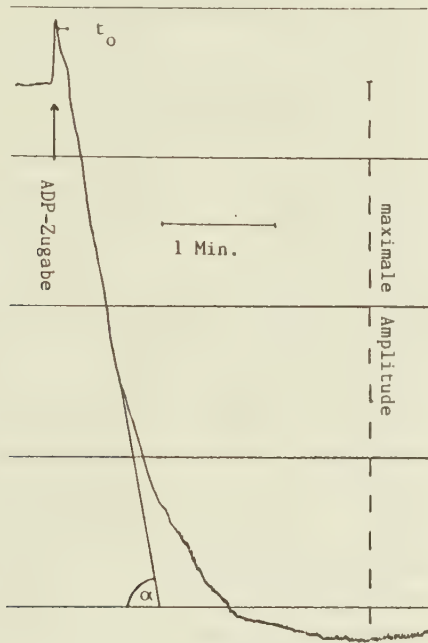


Abb. 13: ADP-induzierte Aggregation

2.2.2.3.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation

Auch hier wurde die Reaktionszeit t_0 , der Tangens des Winkels α , die prozentuale Hemmung der maximalen Aggregation und die Zeit $T_{\tan}$ bestimmt.

Weiterhin wurde die Zeit $t_{0,5\max}$ gemessen, d.h. die Zeitspanne, die - gemessen von der Aggreganzzugabe - benötigt wurde, bis die Kurve bei der Aggregation in Gegenwart eines Inhibitors die Hälfte der maximalen Amplitude des

Leerwertes erreicht hatte.

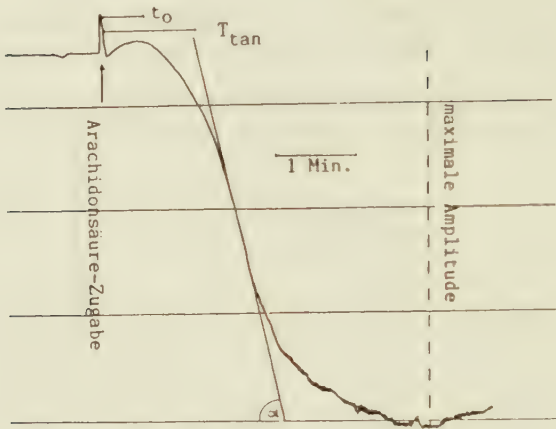


Abb. 14: Arachidonsäure-induzierte Aggregation

2.2.2.3.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation

Bei Ristocetin wurde ebenfalls die Reaktionszeit t_0 , der Tangens des Winkels α , der allerdings für die erste und zweite Phase der Aggregation getrennt ermittelt wurde, sowie die prozentuale Hemmung der Aggregation bestimmt.

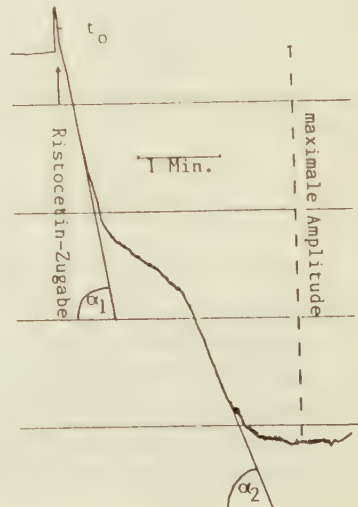


Abb. 15: Ristocetin-induzierte Aggregation

2.3. Messung der Aggregation im Vollblut

2.3.1. Methode der Vollblutaggregometrie

Das Prinzip der verwendeten Methode, die von Cardinal und Flower (26,44) erstmals genauer beschrieben wurde, ist die Widerstandsänderung zwischen zwei in Vollblut getauchte Elektroden durch Anlagerung von Thrombozyten, die durch einen Schreiber aufgezeichnet wird.

Bei dem uns zur Verfügung stehenden Vollblutaggregometer handelte es sich um das Modell 540 der Chrono-Log-Corporation, Havertown, USA, in dem sowohl Aggregationsmessungen im Vollblut als auch im PRP durchgeführt werden können. Der verwendete Zweikanal-Schreiber war von Coulter Electronics GmbH, Krefeld. Das Gerät konnte mit zwei jeweils voneinander unabhängigen, runden silikonisierten Glasküvetten beschickt werden, die die Probe, 1 ml Citrat-Vollblut, und einen Teflon-beschichteten Magnetrührer enthielten (Rührgeschwindigkeit 1200 rpm). Die Temperatur im Heizblock unterlag einer elektronischen Kontrolle.

Anschließend wurden zwei feine Platinelektroden in die Probe eingebracht, die zunächst von einer einschichtigen Thrombozytenauflage umgeben wurden.

Während dieser Zeit konnten am Gerät einige weitere Maßnahmen ergriffen werden:

Durch Drücken des Knopfes "set baseline" konnte die Spannung am Aggregometerausgang auf 0 V reduziert werden, und der "abgekoppelte" Schreiber auf eine Grundlinie (mechanischer Nullpunkt) eingestellt werden.

Weiterhin mußte die Größe des Schreiberausschlags festgelegt werden, den die jeweilige Widerstandsänderung nach sich ziehen sollte ("Spreizung"). Diese Eichung erfolgte durch Druck auf einen Kalibrierknopf (calibrate switch), der eine

standardisierte Widerstandsänderung von 5 Ohm zwischen den Elektroden bewirkte und einen entsprechenden Schreiber-ausschlag nach sich zog. Die Größe des Schreiberausschlags konnte nun durch einen Drehknopf (gain control) reguliert werden, mit dem sich die "Spreizung" erhöhen oder vermindern ließ.

In den ersten ein bis drei Minuten nach Anbringen der Elektroden kam es zu Abweichungen des Schreibers von der eingestellten Grundlinie, bis die Probe die stabile Temperatur von 37°C erlangt hatte. Dann konnte die Ausgangslinie mit dem Kontroll-Drehknopf (zero control) in die gewünschte Position gebracht werden. Dies war nach ca. drei Minuten erreicht und bedeutete, daß nun im gerührten Blut allenfalls minimale Widerstandsänderungen auftraten. Nach Registrierung der 5 Ohm-Eichzacke konnte durch Zugabe der aggregationsauslösenden Substanz die Aggregation induziert werden, wobei sich im Verlauf immer mehr Thrombozyten an die Elektroden anlagerten und durch veränderte Leitfähigkeit der Widerstand zwischen den Elektroden erhöht wurde. Die Widerstandsänderung wurde über einen Schreiber als Funktion der Zeit registriert.

Unabhängig von den Meßproben konnten beide Heizblöcke des Aggregometers mit jeweils sechs Proben zur Erwärmung auf 37°C beschickt werden.

Nach Beginn der Aggregation erreichte diese nach Kollagen- bzw. Arachidonsäure-Zugabe oft erst nach 15-18 Minuten, nach ADP-Zugabe nach 7-10 Minuten das Maximum und damit wesentlich später als im PRP. Die Aggregationskurve verlief dabei monophasisch. Anschließend wurde die Probe aus dem Gerät genommen, die Elektrode entfernt, mit 0,9 %igem NaCl gespült, vorsichtig mechanisch gereinigt und nochmals gespült. Danach konnte die Elektrode in die nächste Probe eingebracht werden.

Der letzte Aggregationstest erfolgte im Vollblut ca. 60 Minuten nach Blutentnahme, wobei sich bei nochmaliger Leerwertbestimmung eine gute Übereinstimmung mit dem

Ausgangswert zeigte. Vorversuche ergaben, daß dies nach einem Zeitintervall von mehr als 90 Minuten nicht mehr gewährleistet war.

2.3.2. Durchführung der Aggregationsmessung im Vollblut

Etwa 30 Minuten vor Beginn der Aggregationsmessungen mußte das Aggregometer eingeschaltet werden, um die gewünschte Temperatur von 37°C zu erhalten. Weiterhin wurde am Gerät die richtige Schalterstellung für den Magnetrührer (stirrer on) sowie die korrekten Einstellungen am Schreiber (Papier-vorschub 2,5 cm/Minute, Spannung 100 mV) überprüft.

Nachdem das Aggregometer die gewünschte Temperatur von 37°C erreicht hatte, erfolgte die Blutentnahme wie unter 2.2.1.1. beschrieben an den gleichen Probanden.

In die Glasküvetten wurde ein teflonbeschichteter Magnetrührer gebracht und jeweils 1 ml Vollblut nach vorsichtigem Wenden der Blutprobe mit einer Eppendorf-Pipette eingefüllt. Sollte Arachidonsäure als aggregationsauslösende Substanz verwendet werden, mußten zusätzliche 3 ml Blut entnommen werden, die für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert wurden und das notwendige plättchenfreie Plasma ergaben (s.a. 2.1.1.3.2.).

Dann wurden die Elektroden eingebracht und die Küvette ins Aggregometer gesetzt, anschließend mit einer Kapillarpipette jeweils entweder 40 μl Puffer oder 40 μl Inhibitorlösung zugegeben und die Stoppuhr in Gang gesetzt sowie der Heizblockdeckel geschlossen.

Während der nun folgenden Äquilibrierungsphase wurde in der unter 2.3.1. beschriebenen Weise vorgegangen.

Der Schreiber wurde nach Abschluß der Äquilibrierungsphase durch den Kontrollknopf (zero control) auf die 10 %-Linie gebracht.

Exakt drei Minuten nach Zugabe des Puffers bzw. der Inhibitorlösung wurde der Heizblockdeckel geöffnet, mit der

Kapillarpipette die aggregationsauslösende Substanz schnell und tief in die Küvette pipettiert und der Deckel geschlossen, um Temperaturschwankungen möglichst zu vermeiden. In der Folgezeit setzte je nach aggregationsinduzierender Substanz und Inhibitorkonzentration in den meisten Fällen nach unterschiedlicher Latenzzeit eine Aggregation ein. Der Aggregationsvorgang wurde, sofern er nicht schon abgeschlossen war, nach 18 Minuten unterbrochen, die Probe entfernt und die Elektroden gereinigt.

2.3.3. Typische Aggregationskurven ohne Inhibitor und Auswertungskriterien

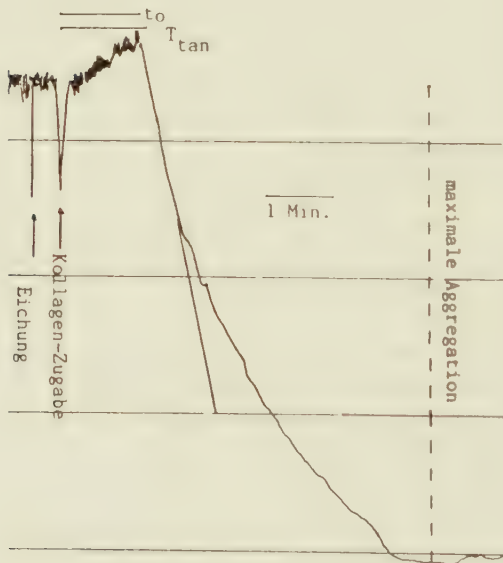


Abb. 16: Kollagen-induzierte Aggregation

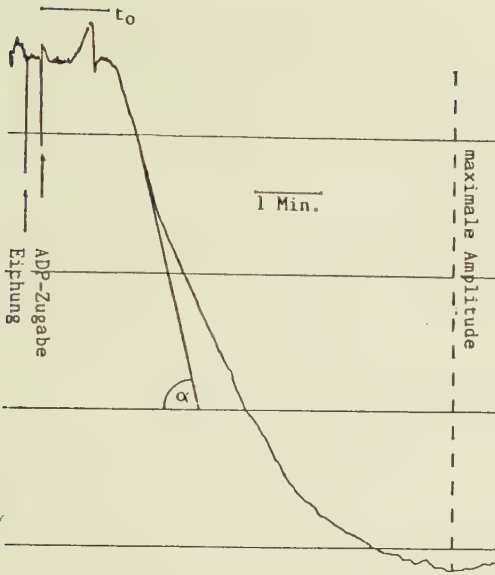


Abb. 17:
ADP-induzierte
Aggregation

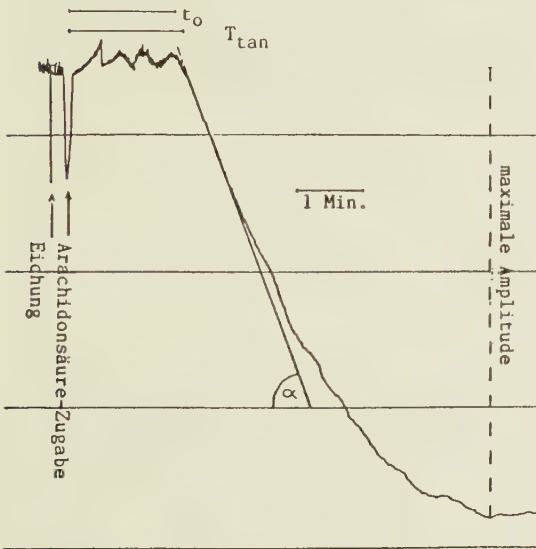


Abb. 18:
Arachidonsäure-
induzierte
Aggregation

Bei der Auswertung der Versuchsreihen der Kollagen-, ADP- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation wurde wie im PRP vorgegangen (s.2.2.2.3.).

2.4. Messung der Thromboxan-Freisetzung nach Kollagen-induzierter Aggregation in plättchenreichem Plasma und Vollblut in Gegenwart der Inhibitoren

2.4.1. Probengewinnung

2.4.1.1. Vorgehen im plättchenreichen Plasma

Die Blutentnahme wurde an den gleichen Probanden vorgenommen, die schon bei den Aggregationsreihen zur Verfügung gestanden hatten. Bei der Blutentnahme und Gewinnung des PRP wurde vorgegangen wie unter 2.2.1. beschrieben.

Je 1 ml wurde in eine Rundkuvette pipettiert, die einen Magnetrührer enthielt. Nachdem die Proben in das Aggregometer gebracht waren und kontinuierlich gerührt wurden, wurden 40 μ l Puffer bzw. 40 μ l der jeweiligen Inhibitorlösung zugegeben und die Stoppuhr eingeschaltet. Die Inhibitorkonzentration war dabei in einer Größenordnung gewählt, die bei den vorherigen Aggregationsreihen im PRP und Vollblut eine Aggregationshemmung von ca. 50 % ergeben hatte. Nach genau drei Minuten wurde dann 1 μ g/ml Kollagen zupipettiert und wieder die Stoppuhr in Gang gesetzt.

Nach verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 Minuten, d.h. sofort nach Kollagenzugabe, und 48 Minuten wurden dann 100 μ l der Indomethacin-Unterbrecherlösung in die Kuvette pipettiert und damit die weitere Thromboxansynthese unterbunden.

Jetzt wurde die Probe noch 30 Sekunden gerührt und ins Eisbad gestellt.

Am Ende der Versuchsreihen, maximal 120 Minuten nach Blutentnahme, wurde der Kuvetteninhalt in kleine Reagenzgläser pipettiert und bei 0° C für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Von jeder Probe wurden zweimal 400 μ l Überstand vorsichtig von oben abpipettiert und in einem Eppendorf-Gefaß bis zur Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung der Thromboxanmenge bei -70° C tiefgekühlt.

2.4.1.2. Vorgehen im Vollblut

Im Vollblut wurde weitgehend analog verfahren wie im PRP (s. 2.4.1.1.). Allerdings wurde ein Probenvolumen von 1,5 ml gewählt, was die Zugabe von 60 μ l Puffer bzw. der jeweiligen Inhibitorlösung erforderlich machte. Nach Kollagenzugabe (Endkonzentration 1 μ g/ml) wurde die Aggregation durch Zupipettieren von 150 μ l Indomethacin-Unterbrecherlösung beendet. Das weitere Vorgehen entsprach dem im PRP (s. 2.4.1.1.).

2.4.2. Durchführung des Radioimmunoassays

In Vorversuchen erwies sich eine 20-fache Verdünnung der Proben mit Isogel-Trispuffer (s. 2.1.3.1.) nach dem Auftauen als notwendig. Im weiteren wurde wie folgt verfahren: Nach dem Bereitstellen der Reagenzien (s. 2.1.3.2.) wurden spezielle konische Gefäße (Firma Sarstedt, Nürnberg) aus Polypropylen nummeriert, ins Eisbad gestellt und nach dem unten angegebenen Schema beschickt, wobei das pipettierte Volumen überall 100 μ l betrug.

Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37° C im Wasserbad. Anschließend wurde das Anti-TxB₂-Antikörper-gebundene TxB₂ von dem ungebundenen TxB₂ durch ein zweites Antikörpersystem, bestehend aus Kaninchen-IgG und dem von der Ziege gewonnenen Anti-Kaninchen-Plasma (GARP), getrennt. Hierzu wurden jeweils 100 μ l Kaninchen-IgG und 100 μ l GARP zu allen Proben außer denen für die Bestimmung der Gesamtimpulse (total counts) hinzupipettiert. Nach der Inkubation über 16 Stunden bei +2° C wurden die Proben zur Sedimentierung des präzipitierten Antikörpers zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und der Bodensatz in je 1 ml Riafluor-Szintillationsflüssigkeit gelöst. Die Radioaktivität der Proben wurde anschließend im Counter gemessen.

	Nr.	IGT-Puffer	Standard TxB ₂	Probe	NRS	IRP
Leerwert (NRS)	1-3	0,1ml			0,1ml	
max. Bindung B ₀ (IRP)	4-6	0,1ml				0,1ml
Standard TxB ₂ 400 ng	7-9		0,1ml			0,1ml
Standard TxB ₂ 12,5 ² ng	25-27		0,1ml			0,1ml
Testwerte B	28-45			0,1ml		0,1ml
Leerwert (NRS)	46-48	0,1ml			0,1ml	
max. Bindung B ₀ (IRP)	49-51	0,1ml				0,1ml
Gesamtimpulse						

1. Inkubation: 60 Minuten

³ H-TxB ₂	IgG + GARP
0,1ml	0,1 ml 0,1
↓	↓
↓	↓

2. Inkubation: 16 Stunden

Die TxB₂-Werte wurden mit Hilfe eines Diagramms bestimmt, in dem auf der Abszisse die TxB₂-Werte in pg/ml, auf der Ordinate der Quotient B₀/B aufgetragen wurde. Dieser Quotient wurde folgendermaßen ermittelt: Zunächst wurden die Werte der Dreifachbestimmung für die jeweilige Probe gemittelt und der Leerwert des normalen Kaninchenserums (normal rabbit serum, NRS) subtrahiert. Dabei ergaben sich aus den Proben mit 0,1 ml IGT-Puffer und 0,1 ml Serum vom immunisierten Kaninchen (immuno rabbit plasma, IRP) der Wert für die maximale Bindung B₀, aus den Proben mit Standard-TxB₂ bzw. mit dem zu analysierenden TxB₂-Gehalt die Werte für B. Nun wurde anhand der ermittelten Quotienten B₀/B für die Standard-TxB₂-Werte eine Eichgerade erstellt und mit dieser bei bekanntem Quotienten B₀/B die TxB₂-Werte für die zu analysierenden Proben bestimmt.

2.5. Überblick über das methodische Vorgehen

Blutentnahme		
Aggregationsreihen im PRP	Aggregationsreihen im Vollblut	Thromboxansynthesekinetik
Gewinnung von standardisiertem PRP (Probenvolumen 500 µl)	Vollblutprobe (Volumen 1 ml)	Gewinnung von PRP (Probenvolumen 1 ml) bzw. Verwendung von Vollblut (Probenvolumen 1,5 ml)
Zugabe von Puffer-/Inhibitorlösung (20 µl)	Zugabe von Puffer-/Inhibitorlösung (20 µl)	Zugabe von Puffer-/Inhibitorlösung (40 bzw. 60 µl)
Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz (Kollagen, ADP, Arachidonsäure, Ristocetin)	Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz (Kollagen, ADP, Arachidonsäure)	Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz (Kollagen) Unterbrechung der Aggregation Zentrifugierung
Aufzeichnung der Aggregation	Aufzeichnung der Aggregation	Radioimmunologische Bestimmung der TxB_2 -Werte
Auswertung	Auswertung	Auswertung

3. Ergebnisse

3.1. Aggregationsmessung - Beeinflussung durch Inhibitoren

3.1.1. Darstellung der Aggregationsprotokolle eines Probanden am Beispiel UK 37,248

3.1.1.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248

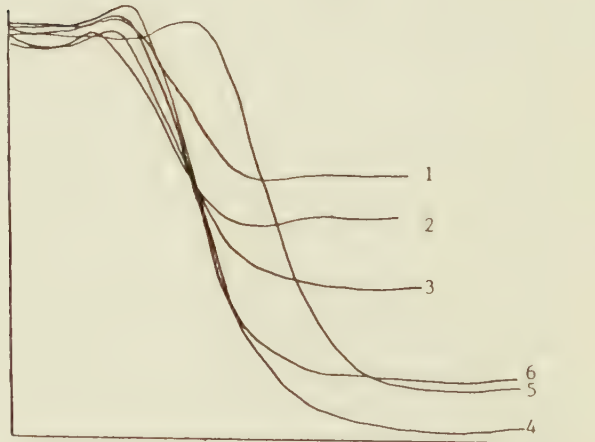


Abb.19: Aggregationskurven der Kollagen-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 2 = $2,8 \times 10^{-5}$ M; 3 = $1,9 \times 10^{-5}$ M; 4 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 5 = $3,7 \times 10^{-7}$ M; 6 = Leerwert ohne Inhibitor) im PRP

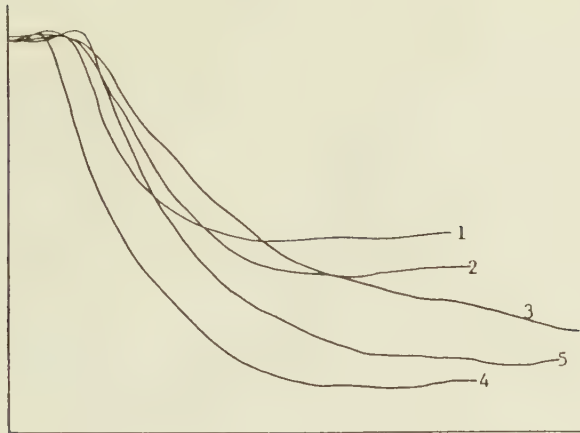


Abb. 20: Aggregationskurven der Kollagen-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 2 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 3 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 4 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 5 = Leerwert ohne Inhibitor) im Vollblut.

3.1.1.2. Die ADP-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248

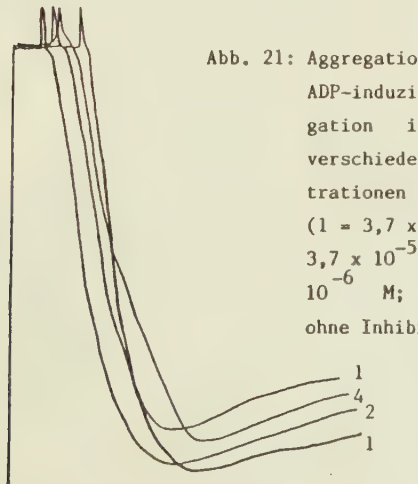
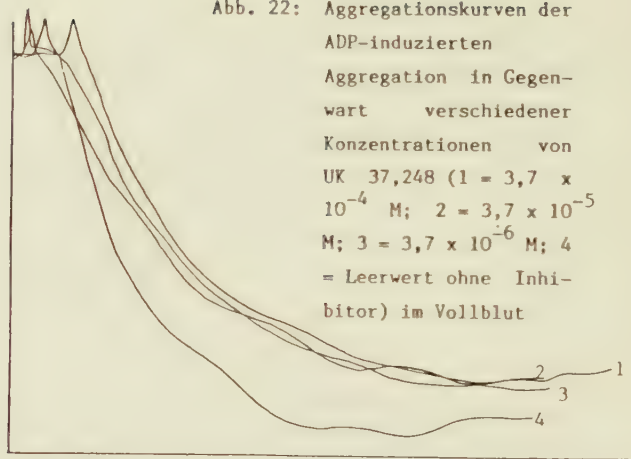


Abb. 21: Aggregationskurven der ADP-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 2 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 3 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 4 = Leerwert ohne Inhibitor) im PRP



3.1.1.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248

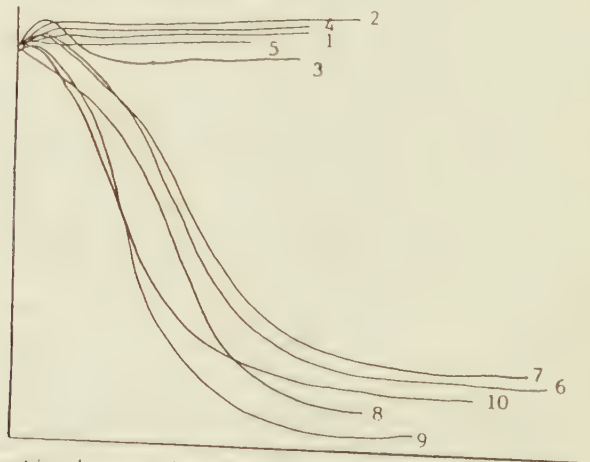


Abb. 23: Aggregationskurven der Arachidonsäure-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 2 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 3 = $2,8 \times 10^{-5}$ M; 4 = $1,9 \times 10^{-5}$ M; 5 = $9,2 \times 10^{-6}$ M; 6 = $4,6 \times 10^{-6}$ M; 7 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 8 = $1,9 \times 10^{-6}$ M; 9 = $9,2 \times 10^{-7}$ M; 10 = Leerwert ohne Inhibitor) im PRP

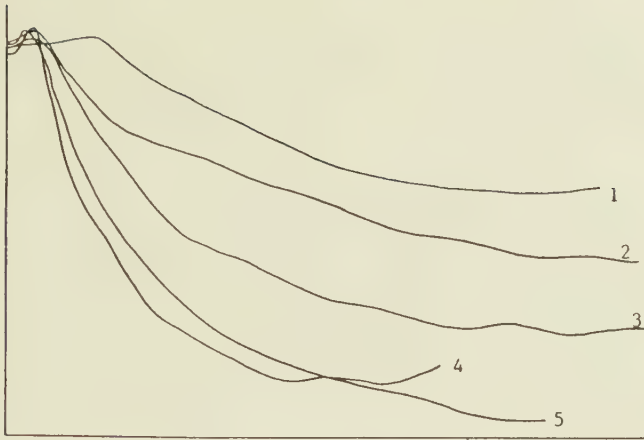


Abb. 24: Die Aggregationskurven der Arachidonsäure-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 2 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 3 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 4 = $3,7 \times 10^{-7}$ M; 5 = Leerwert ohne Inhibitor) im Vollblut

3.1.1.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation in Gegenwart von UK 37,248

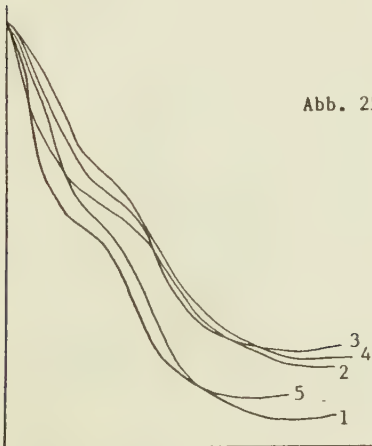


Abb. 25: Aggregationskurven der Ristocetin-induzierten Aggregation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UK 37,248 (1 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; 2 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; 3 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; 4 = $3,7 \times 10^{-7}$ M; 5 = Leerwert ohne Inhibitor) im PRP

3.1.2. Ergebnisse der Versuchsreihen

Die Auswertung erfolgte wie unter 2.2.2.3. angegeben.

3.1.2.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation

Im folgenden werden die Ergebnisse der Kollagen-induzierten Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren dargestellt

(..... = ASS; --- = Indomethacin; — = Piroxicam;
- - - = UK 37,248; ····· = UK 38,485; —··— = BM 13.177;
..... = Bezafibrat)

3.1.2.1.1. Die Kollagen-induzierte Aggregation im PRP

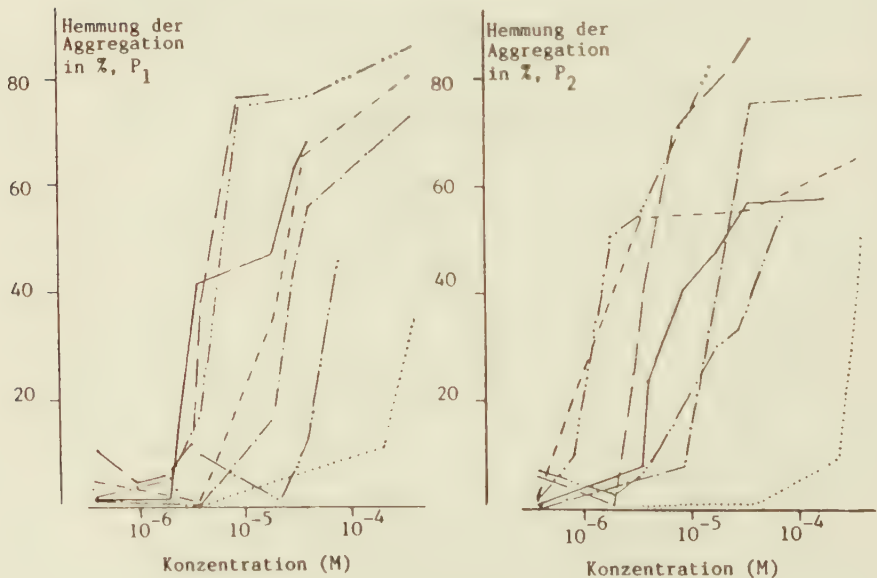


Abb. 26: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf
auf das Ausmaß der Aggregation im PRP

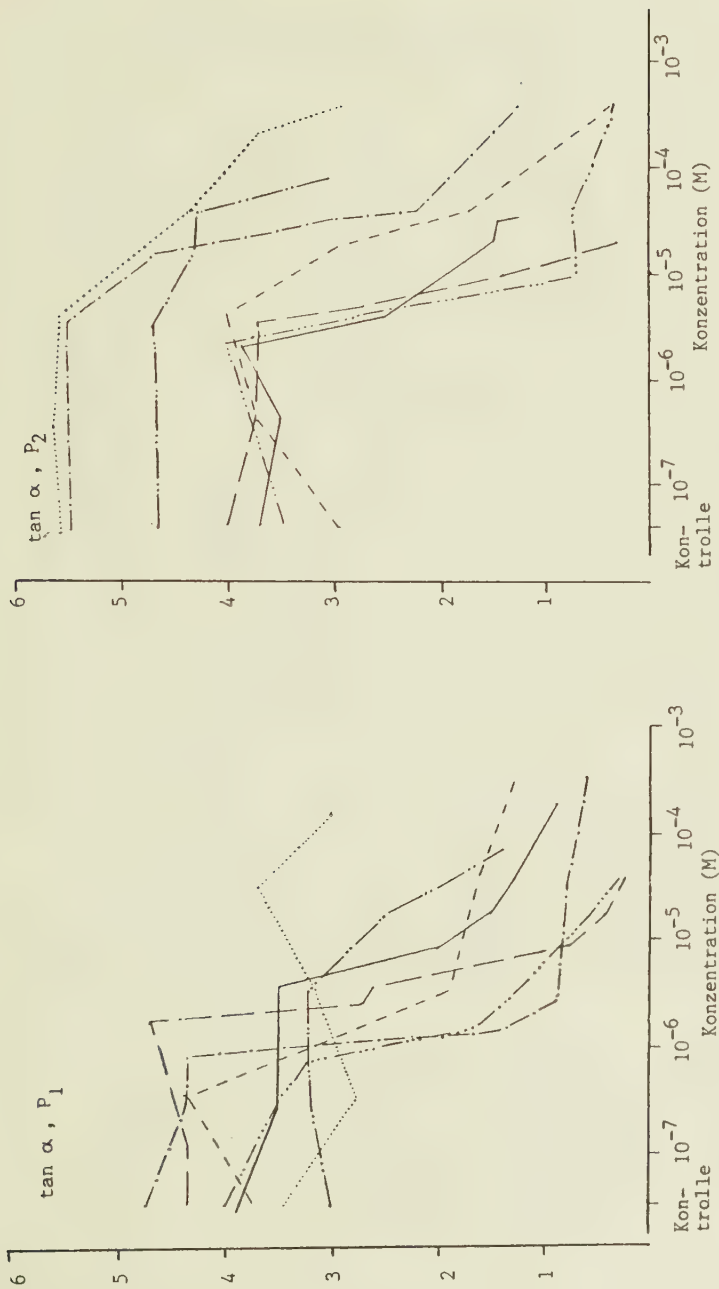


Abb. 27: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit im PRP

Tab. 1: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die Reaktionszeit t_0 im PRP (1=Proband 1; 2=Proband 2; t_0 in Sek.)

	ASS		Indome- thacin		Piroxi- cam		UK 37,248		UK 38,485		BM 13.177		Beza- fibrat	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Kontrolle	104	60	96	112	104	110	70	70	96	76	88	82	80	64
$3,7 \times 10^{-4} M$							64		90	84	80		84	
$3,7 \times 10^{-5} M$	20	64	150		84	116	64	70	90	70	90	94	80	78
$2,8 \times 10^{-5} M$	106						64	80	64					
$1,9 \times 10^{-5} M$	110	50	60	120	110	82	60	100	68	92	80			
$9,2 \times 10^{-6} M$			80	104	92		86			80				
$3,7 \times 10^{-6} M$	96	74	110	66	94	120	78	70	60	90			78	64
$1,9 \times 10^{-6} M$	90		86	72	74					88	66			
$3,7 \times 10^{-7} M$	100		66	80	84	82	72	66	90	66	90	56	100	

Abbildung 26, in der die Beziehung zwischen der Hemmung der Aggregation, also der Verminderung der Amplitude der Aggregationskurve und der Inhibitorkonzentration dargestellt ist, zeigt deutlich eine zunehmende antiaggregatorische Wirkung mit steigender Konzentration des Inhibitors bei allen Substanzen und beiden Probanden.

Bezafibrat entfaltet bei beiden Probanden die eindeutig schwächste inhibitorische Wirkung, während - vor allem ab einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-6}$ M - Indomethacin und BM 13.177 die stärkste Hemmung der Aggregation bewirken.

In der dazwischen befindlichen Gruppe liegt die antiaggregatorische Wirkung von ASS am unteren Rand des Spektrums.

Anhand der Ergebnisse im PRP ist eine Differenzierung zwischen den Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485 bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung nicht möglich.

Abb. 27, die die Beziehung des Tangens α als Maß für die größte Aggregationsgeschwindigkeit zur Inhibitorkonzentration darstellt, weist Parallelen zu Abbildung 26 auf: Hauptsächlich Bezafibrat und auch ASS bewirken, abgesehen von der höchsten verwendeten Konzentration, nur eine geringfügige Verlangsamung des Aggregationsablaufs.

In Gegenwart von Indomethacin und BM 13.177 dagegen wird die Aggregationsgeschwindigkeit stark herabgesetzt.

Die beiden Thromboxansynthetase-Inhibitoren liegen mit Piroxicam wieder im mittleren Bereich.

Die Bestimmung der Werte der Reaktionszeit t_0 (s. Tabelle 1) zeigt, daß sich hier kein Einfluß der Inhibitoren bzw. deren Konzentration feststellen läßt. Die Werte unterliegen gewissen Schwankungen, sind aber innerhalb einer Versuchsreihe im Rahmen dieser Streuung konstant.

Da die Auswertung der Zeit $T_{\tan}$ keine zusätzlichen Informationen ergab, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

3.1.2.1.2. Die Kollagen-induzierte Aggregation im Vollblut

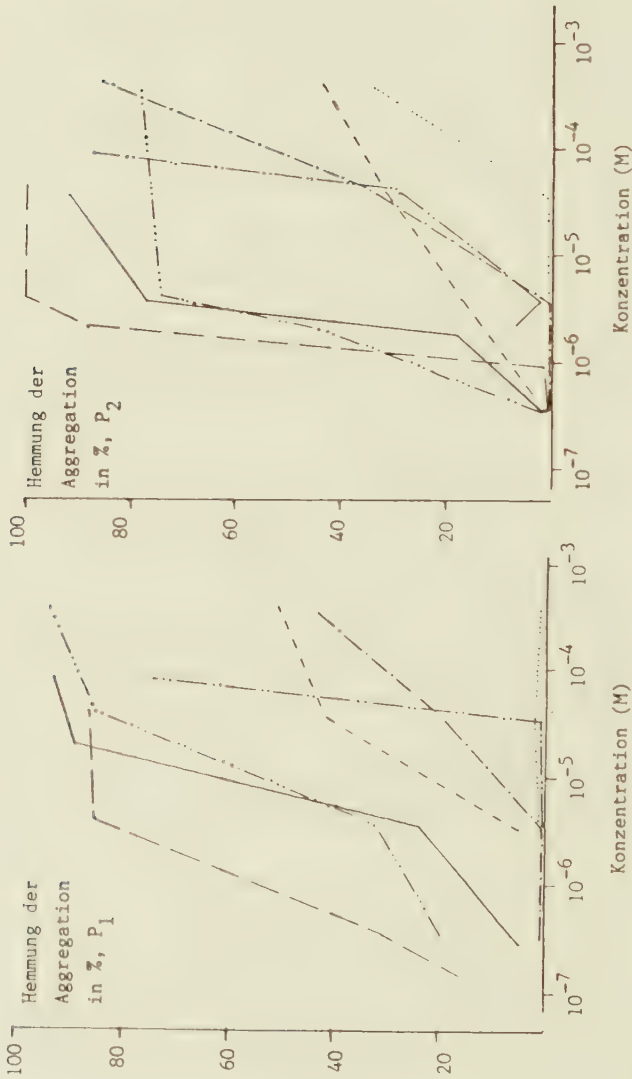


Abb. 28: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf das Ausmaß der Aggregation im Vollblut

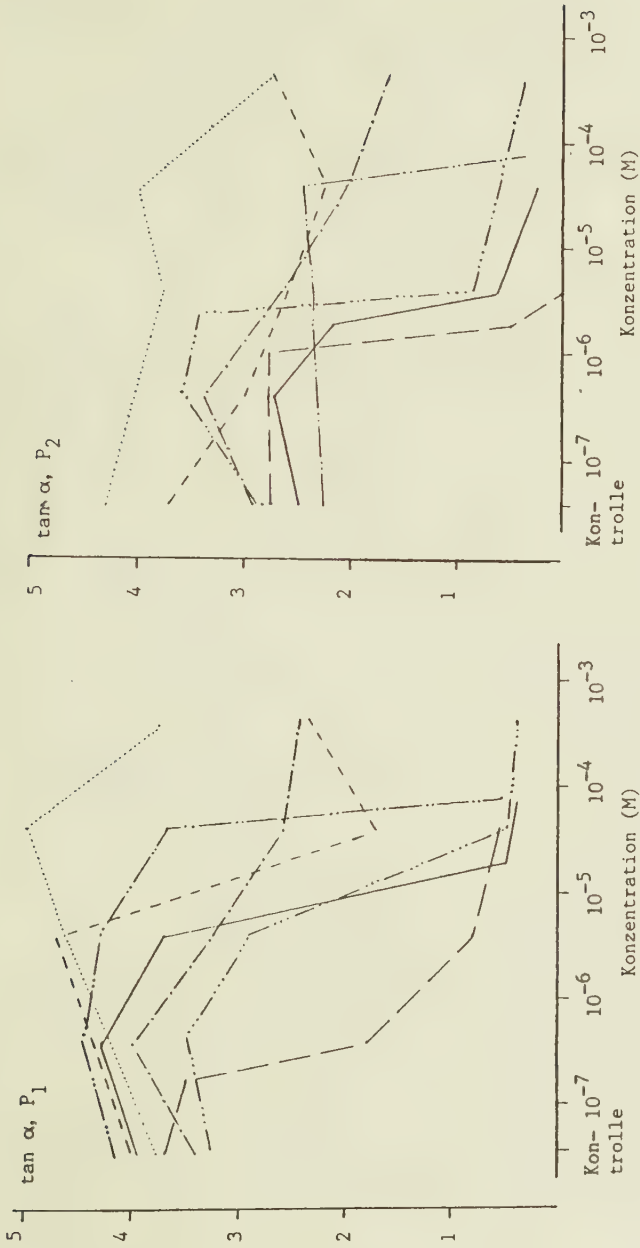


Abb. 29: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit im Vollblut

Tab. 2: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die Reaktionszeit t_0 im Vollblut (1= Proband 1; 2=Proband 2; t_0 in Sek.)

	ASS		Indome- thacin		Piroxi- cam		UK 37,248		UK 38,485		BM 13.177		Beza- fibrat	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Kontrolle	84	108	90	108	90	132	90	96	84	60	96	84	84	102
$3,7 \times 10^{-4} \text{ M}$							90	96	78	98	140	140	90	108
$7,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	84	96			144									
$3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$		120	120		144	114	96	90	84	84	96		72	96
$3,7 \times 10^{-6} \text{ M}$	66	84	90		120		78	90	96	84	80	132	78	108
$1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$		102		120		114								
$3,7 \times 10^{-7} \text{ M}$	66		120	132	108	72	48	84	96	96	78			

In der Dosiswirkungskurve im Vollblut erweist sich ebenfalls Bezafibrat als der schwächste Inhibitor, es tritt überhaupt nur bei einem Probanden in der höchsten getesteten Konzentration eine erkennbare Hemmung auf.

Indomethacin dagegen wirkt auch in niedrigen Konzentrationen stark antiaggregatorisch.

Auch BM 13.177 und Piroxicam entfalten schon im Konzentrationsbereich von $3,7 \times 10^{-6}$ bis $3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ eine ausgeprägte aggregationshemmende Wirkung.

ASS und UK 38,485, die im unteren Konzentrationsbereich keine oder nur geringe inhibitorische Wirkung zeigen, lassen eine entscheidende Wirkungszunahme bei den höchsten verwendeten Konzentrationen erkennen.

UK 37,248 nimmt bei beiden Probanden eine Mittelstellung ein. Die Substanz zeigt deutliche aggregationshemmende Effekte, die aber im gemessenen Bereich klar hinter den stark inhibitorischen Substanzen zurückliegen.

Die Agenzien, die schon auf die Amplitude der Aggregationskurve stark einwirken (s. Abbildung 28), haben auch einen deutlichen Einfluß auf die maximale Geschwindigkeit des Aggregationsablaufs (s. Abbildung 29).

In einer Konzentration unter $3,7 \times 10^{-7}$ M läßt sich unter keiner Substanz eine Wirkung erkennen.

In höheren Konzentrationen verlangsamen jedoch Indomethacin, Piroxicam und BM 13,177 den Aggregationsvorgang deutlich.

ASA zeigt in der höchsten verwendeten Konzentration einen starken Wirkungsanstieg, während es im unteren Bereich kaum wirksam ist.

Die Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485 sowie Bezafibrat haben bei beiden Probanden nur in den höheren Konzentrationen ($3,7 \times 10^{-5}$ M bzw. $3,7 \times 10^{-4}$ M) einen gewissen Einfluß auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit.

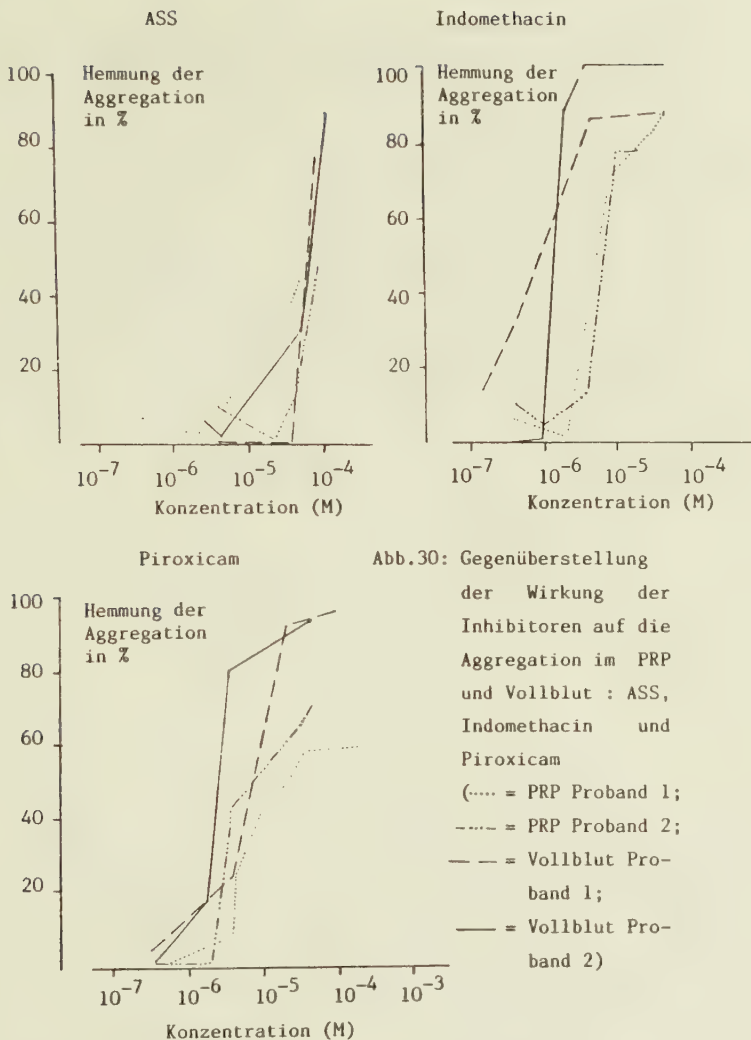
Auch im Vollblut gilt, daß keine klaren Effekte der Inhibitoren oder ihrer Konzentration auf die Reaktionszeit t_o von der Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz bis zum Einsetzen der Aggregation festzustellen sind. Vielmehr liegt auch im Vollblut eine Streuung innerhalb eines gewissen Zeitbereichs vor. Dies zeigen auch die für die Zeit T_{tan} gemessenen Werte, die nicht gesondert aufgeführt sind.

3.1.2.1.3. Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse im PRP und Vollblut

Die Dosiswirkungskurven für ASS (s. Abbildung 30) zeigen im Konzentrationsbereich unter $1,9 \times 10^{-5}$ M keine oder allenfalls geringfügige aggregationshemmende Wirkung, während bei einer nur wenig höheren Konzentration ($7,4 \times 10^{-5}$ M) sowohl im PRP als auch im Vollblut ein deutlicher Anstieg der aggregationshemmenden Wirkung sichtbar wird. Abbildung 30 macht den bei einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-5}$ M schon stark abgeschwächten Effekt deutlich, bei einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-7}$ M läßt sich bei keinem Probanden in PRP oder Vollblut mehr eine Verminderung der maximalen Aggregation erkennen.

Indomethacin ist bei beiden Probanden über den gesamten Konzentrationsbereich gesehen eine der beiden am stärksten wirksamen Substanzen. Dies gilt sowohl für das PRP als auch für das Vollblut, wobei in letzterem die Dosiswirkungskurven nach links verschoben sind.

Auch für Piroxicam zeigen die Dosiswirkungskurven bezüglich der maximalen Aggregation im Vollblut eine Linksverschiebung, wobei die antiaggregatorische Wirkung vor allem in den höheren Konzentrationen um $3,7 \times 10^{-5}$ M im Vollblut gegenüber dem PRP noch eindeutiger hervortritt. In einer Konzentration von $1,9 \times 10^{-7}$ M war in keinem Fall mehr die Aggregation zu beeinflussen.



Bei den Thromboxansynthetase-Inhibitoren zeigt sich dagegen eine andere Tendenz:

UK 37,248, dessen antiaggregatorisches Potential im Vergleich zu den anderen Substanzen eine Mittelstellung

einnimmt, zeigt im Vollblut gerade im höheren Konzentrationsbereich eine geringere Hemmung der Aggregation und daher eine Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve gegenüber den Versuchsreihen im PRP.

Dies gilt bei einem Probanden auch für UK 38,485, während diese Substanz bei dem anderen Probanden in der höchsten untersuchten Konzentration von $3,7 \times 10^{-4}$ M den schon erwähnten starken Wirkungsanstieg zeigte und in dieser Konzentration die Aggregation im Vollblut stärker hemmte als im PRP. In den darunter liegenden Konzentrationen ist die inhibitorische Wirkung teilweise erheblich geringer als z.B. bei Indomethacin oder BM 13.177.

Auch bei den Thromboxansynthetase-Inhibitoren ist in einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-7}$ M keine antiaggregatorische Wirkung mehr nachweisbar.

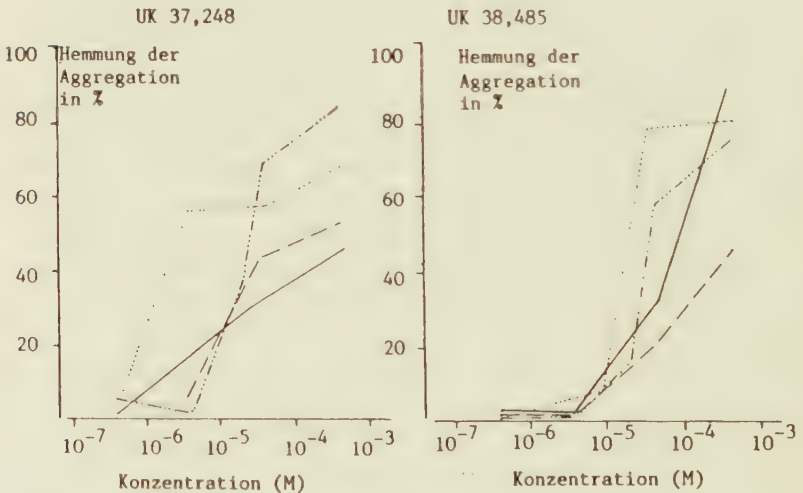


Abb. 31: Gegenüberstellung der Wirkung der Inhibitoren auf die Aggregation in PRP und Vollblut: UK 37,248 und UK 38,485 (..... =PRP Proband 1; =PRP Proband 2; — — = Vollblut Proband 1; — — =Vollblut Proband 2)

BM 13.177 erweist sich im PRP und Vollblut bei Betrachtung des gesamten Konzentrationsbereichs als im PRP neben Indomethacin und im Vollblut neben Indomethacin und Piroxicam stärkster Aggregationshemmer. Eindeutige Unterschiede zwischen der durch BM 13.177 modulierten Aggregation im PRP und Vollblut sind nicht festzustellen.

Bezafibrat besitzt bei beiden Probanden im PRP wie auch im Vollblut die schwächste inhibitorische Wirkung und kann als einzige Substanz in einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-5}$ M die Aggregation weder im PRP noch im Vollblut hemmen. In einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-4}$ M beginnt sich ein antiaggregatorischer Effekt im PRP beider und im Vollblut des einen Probanden zu zeigen.

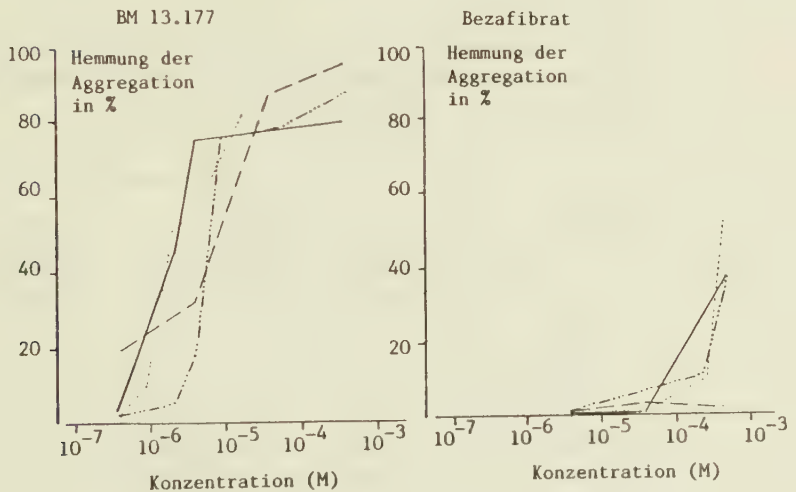


Abb. 32: Gegenüberstellung der Wirkung der Inhibitoren auf die Aggregation im PRP und Vollblut (..... =PRP Proband 1; -.-.- =PRP Proband 2; --- =Vollblut Proband 1; — =Vollblut Proband 2)

Wie Abb. 26-29 zeigen, geht eine Verminderung der Aggregationsamplitude weitgehend mit einer Verlangsamung des Aggregationsablaufs einher. Beide Phänomene sind von der Art des Inhibitors und dessen Konzentration abhängig.

Die Messung der Reaktionszeit t_0 (s. Tab. 1 und 2) ließ keine Abhängigkeit von den Inhibitoren oder deren Konzentration erkennen. Der Beginn der Aggregation unterliegt gewissen Schwankungen und erfolgt in einer Zeitspanne von ca. 60-120 Sekunden nach Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz. Dies gilt für die photometrische Messung im PRP wie auch für die Impedanzmethode im Vollblut.

3.1.2.2. Die ADP-induzierte Aggregation

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Versuchsreihen der ADP-induzierten Aggregation in Gegenwart der jeweils höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration.

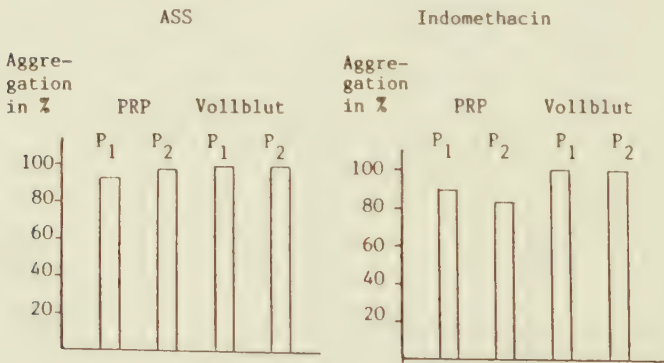
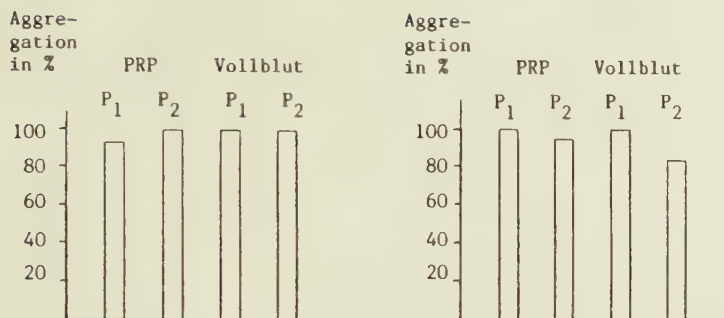


Abb.33: Einfluß der jeweils höchsten zur Verfügung stehenden Inhibitorkonzentration auf das Ausmaß der ADP-induzierten Aggregation im PRP und Vollblut (Konzentrationen für ASS = $7,4 \times 10^{-5}$ M; Indomethacin $3,7 \times 10^{-4}$ M).

Piroxicam

UK 37,248



UK 38,485

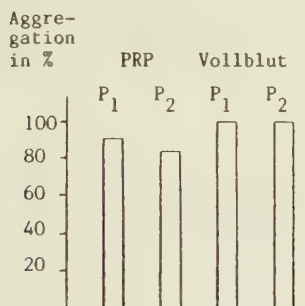


Abb.34: Einfluß der jeweils höchsten zur Verfügung stehenden Inhibitorkonzentration auf das Ausmaß der ADP-induzierten Aggregation im PRP und Vollblut (Konzentrationen für Piroxicam = $1,9 \times 10^{-4}$ M; UK 37,248, UK 38,485 = $3,7 \times 10^{-4}$ M. Die Amplitude der ADP-induzierten Aggregation ohne Inhibitorzugabe stellt den 100%-Wert dar.

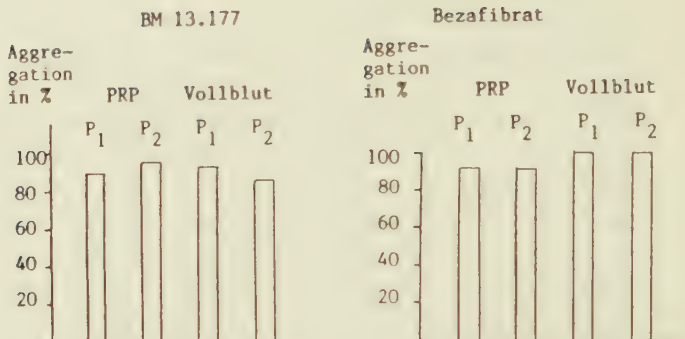


Abb.35: Einfluß der jeweils höchsten zur Verfügung stehenden Inhibitorkonzentration auf das Ausmaß der ADP-induzierten Aggregation im PRP und Vollblut (Konzentrationen für BM 13.177 und Bezafibrat = $3,7 \times 10^{-4}$ M). Die Amplitude der ADP-induzierten Aggregation ohne Inhibitorzugabe stellt den 100%-Wert dar.

Tab. 3: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Geschwindigkeit der ADP-induzierten Aggregation ($\tan \alpha$) und die Reaktionszeit t_o (in Sek.) im PRP, dargestellt am Beispiel Piroxicam

PRP	Proband 1		Proband 2	
Konzentration	t_o	$\tan \alpha$	t_o	$\tan \alpha$
Kontrolle	2	6,31	4	6,31
$1,9 \times 10^{-4}$ M	2	6,31	4	6,31
$3,7 \times 10^{-5}$ M	2	5,67	4	6,31
$3,7 \times 10^{-6}$ M	2	6,31	4	6,31

Tab. 4: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Geschwindigkeit der ADP-induzierten Aggregation ($\tan \alpha$) und die Reaktionszeit t_o (in Sek.) im Vollblut, dargestellt am Beispiel Piroxicam

Vollblut	Proband 1		Proband 2	
Konzentration	t_o	$\tan \alpha$	t_o	$\tan \alpha$
Kontrolle	48	3,48	60	3,08
$9,2 \times 10^{-5} \text{ M}$	54	5,15	72	2,48
$3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$	36	4,70	54	3,48
$3,7 \times 10^{-6} \text{ M}$	42	4,33	66	2,90

Wie aus Abb. 33-35 ersichtlich, kommt es auch bei höchster Konzentration des jeweiligen Inhibitors im PRP und im Vollblut durch keine der Substanzen bei der ADP-induzierten Aggregation zu einer Beeinträchtigung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten. Auch die Maximalgeschwindigkeit der Aggregation bleibt unberührt, wie das für alle anderen Inhibitoren gleichermaßen gültige Beispiel Piroxicam zeigt. Die Reaktionszeit t_o wird durch die Inhibitoren ebenfalls nicht verändert.

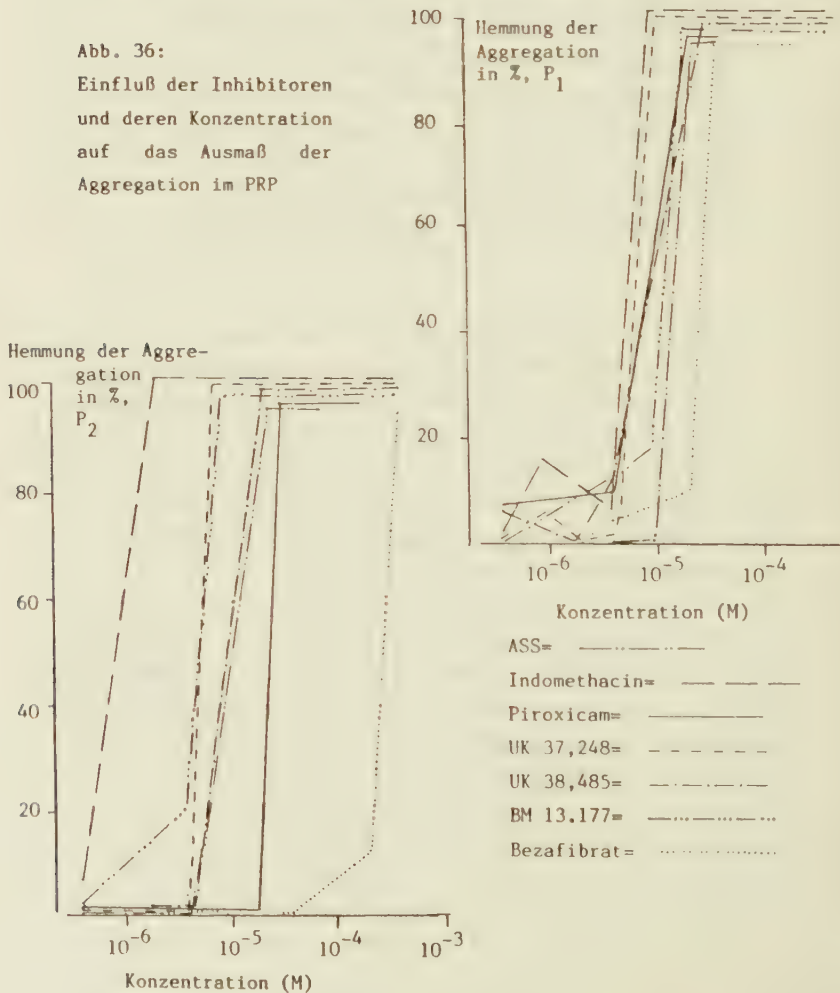
Im Vollblut schwankt die Reaktionszeit jeder Versuchsreihe um einen Mittelwert und setzt durchschnittlich nach 40-90 Sekunden ein, während im PRP die Aggregation unmittelbar nach Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz erfolgt.

3.1.2.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation

Die folgenden Abbildungen 36-39 zeigen die Ergebnisse der Aggregationsreihen in Gegenwart der Inhibitoren, in denen Arachidonsäure als aggregationsinduzierende Substanz verwendet wurde.

3.1.2.3.1. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im PRP

Abb. 36:
Einfluß der Inhibitoren
und deren Konzentration
auf das Ausmaß der
Aggregation im PRP



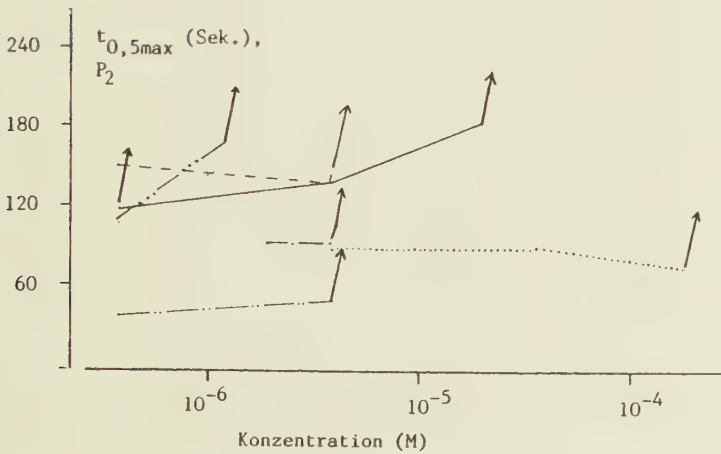
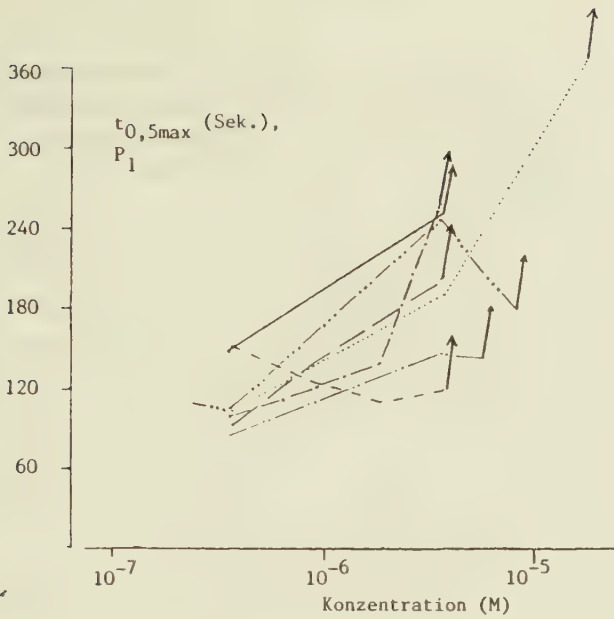


Abb. 37: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die Zeit $t_{0,5\max}$ im PRP (das Ausbleiben der Aggregation mit im Unendlichen liegender Zeit $t_{0,5\max}$ ist mit einem Pfeil gekennzeichnet)

Tab. 5: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Geschwindigkeit der Arachidonsäure-induzierten Aggregation, dargestellt am Beispiel UK 37,248

Konzentration	Proband 1 tan α	Proband 2 tan α
Kontrolle	3,48	2,36
$9,2 \times 10^{-6}$ M	2,75	2,48
$3,7 \times 10^{-6}$ M	2,90	2,61
$3,7 \times 10^{-7}$ M	3,73	2,61

Aus Abbildung 36 geht hervor, daß sich die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im PRP in Gegenwart von Inhibitoren als eine Alles-oder-nichts-Reaktion darstellt, wobei der Aggregationsvorgang bis zu einer gewissen Inhibitorkonzentration ungehindert abläuft, bei einer relativ wenig höheren Konzentration aber vollkommen gehemmt wird.

Als völlige Hemmung wurde bewertet, wenn vier Minuten nach Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz noch keine Aggregation eingesetzt hatte.

Während die Schwellenkonzentration, über der eine vollkommene Aggregationshemmung auftrat, bei fast allen Versuchsreihen bei einer Inhibitorkonzentration von etwa $3,7 \times 10^{-6}$ M lag, ist dieser Wert bei einem Probanden für Indomethacin etwas nach links verschoben, d.h. eine völlige Hemmung tritt schon bei Konzentrationen von über $3,7 \times 10^{-7}$ M auf, während bei Bezafibrat eine vollkommene Hemmung erst bei einer Konzentration von $3,7 \times 10^{-4}$ M auftritt.

Abbildung 37 gibt die Beziehung zwischen den Inhibitoren bzw. deren Konzentration und der Zeit $t_{0,5max}$ an, die benötigt wurde, bis die Amplitude der Aggregationskurve ein Ausmaß von 50% der maximalen Aggregation erreicht hatte. Der 100%-Wert ergab sich aus der Amplitude der Arachidonsäure-induzierten Aggregation ohne Inhibitorzugabe.

Tendenziell deutet sich dabei eine Verlängerung der Zeitspanne $t_{0,5max}$ mit steigender Inhibitorkonzentration an.

Die Konzentrationen, über denen sich eine Aggregation nicht mehr auslösen ließ, und bei denen die Zeit $t_{0,5max}$ praktisch im Unehdlichen lag, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Reaktionszeit t_o und Zeit T_{tan} , die in die gleiche Richtung wiesen, sind nicht gesondert aufgeführt.

Das Beispiel UK 37,248, (s. Tab. 5), das repräsentativ für die anderen Inhibitoren ist, zeigt deutlich, daß, falls die Aggregation in Gegenwart eines Inhibitors einsetzt, diese auch in ihrer maximalen Aggregationsgeschwindigkeit durch Inhibitoren nicht beeinflußt wird.

3.1.2.3.2. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut



Abb. 38: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf das Ausmaß der Aggregation im Vollblut (ASS = —; Indomethacin = ---; Piroxicam =; UK 37,248 = - - - - -; UK 38,485 = - · - · - ·; BM 13.177 = - - - - -; Bezafibrat =)

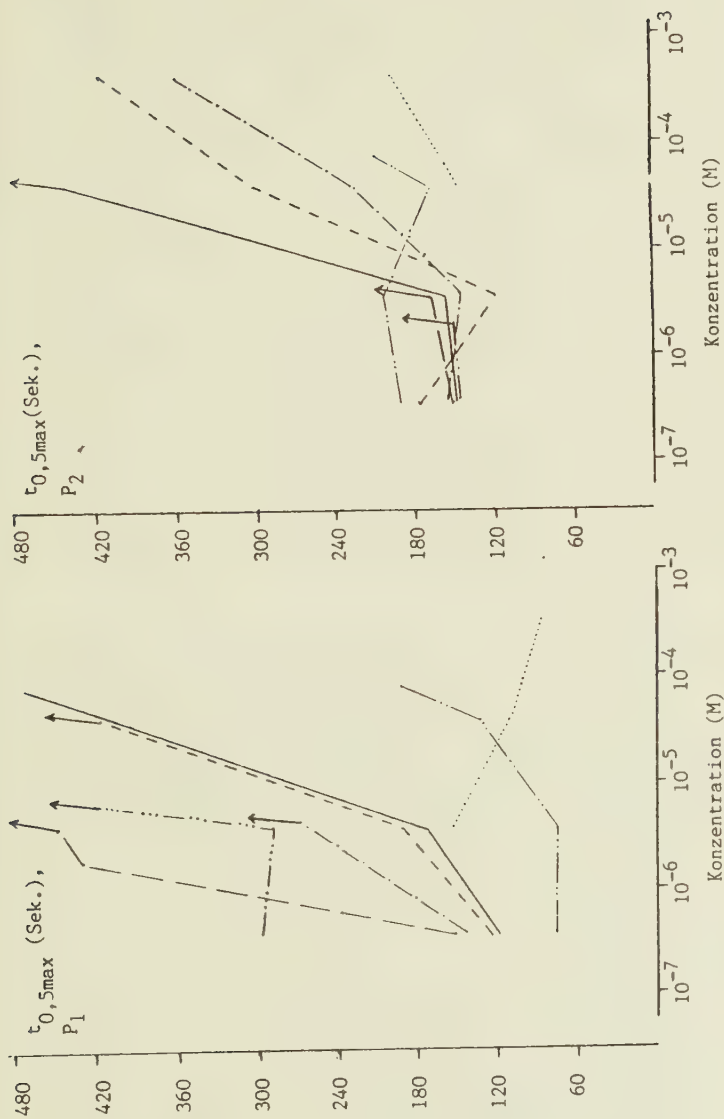


Abb. 39: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die Zeit $t_{0,5max}$ im Vollblut

Tab. 6: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die Reaktionszeit t_o (in Sekunden) und die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ($\tan \alpha$), dargestellt am Beispiel Piroxicam

Konzentration	Proband 1		Proband 2	
	t_o	$\tan \alpha$	t_o	$\tan \alpha$
Kontrolle	60	2,48	78	2,61
$7,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	196	1,24	210	0,60
$3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$			134	0,90
$3,7 \times 10^{-6} \text{ M}$	78	1,88	84	2,75
$3,7 \times 10^{-7} \text{ M}$	60	3,27	60	2,90

Während sich im PRP die Arachidonsäure-induzierte Aggregation als Alles-oder-nichts-Reaktion darstellte, ergab sich im Vollblut eine zunehmende Aggregationshemmung mit zunehmender Inhibitorkonzentration, vergleichbar mit dem Aggregationsverhalten bei der Kollagen-induzierten Aggregation.

Was den Einfluß der Inhibitoren auf die maximale Aggregation anbelangt fällt auf, daß bei beiden Probanden wieder Indomethacin und auch BM 13.177 eine starke inhibitorische Wirkung ausüben, während diese bei ASS und Bezafibrat praktisch ausbleibt.

UK 37,248 und Piroxicam nehmen in guter Übereinstimmung bei beiden Probanden eine Mittelstellung zwischen den sehr stark und fast nicht hemmenden Substanzen ein, wobei inhibitorische Effekte aber deutlich sichtbar sind.

Die Dosiswirkungskurve verläuft für UK 38,485 bei den Probanden sehr unterschiedlich. Während sie bei Proband 1

steil ansteigt, verläuft sie bei Proband 2 eher flach, wenn auch in höheren Konzentrationen die antiaggregatorische Wirkung deutlich erkennbar ist.

Das Beispiel Piroxicam (s. Tabelle 6), das auch für die anderen Inhibitoren Gültigkeit besitzt, zeigt, daß sowohl die Reaktionszeit t_0 als auch die maximale Aggregationsgeschwindigkeit durch die Inhibitoren beeinflusst wird. Beide Parameter gehen in die Zeit $t_{0,5max}$ ein.

Den Zusammenhang zwischen $t_{0,5max}$ und den Inhibitoren bzw. deren Konzentrationen demonstriert Abb. 39. Es zeigt sich, wie schon das Beispiel Piroxicam andeutet, daß in den Fällen, in denen eine Aggregationshemmung stattfindet, mit einer Steigerung der Inhibitorkonzentration auch eine Verlängerung der Zeit $t_{0,5max}$ einhergeht.

Bei Indomethacin und BM 13.177 ist dieser Effekt schon in geringen Konzentrationen stark ausgeprägt, d.h. es wird schon eine vollkommene Unterdrückung der Aggregation in niedrigen Konzentrationsbereichen erreicht und $t_{0,5max}$ liegt im Unendlichen, was mit einem Pfeil gekennzeichnet ist.

Bei ASS und Bezafibrat tritt der Effekt der Verlängerung der Zeit $t_{0,5max}$ zurück, da im untersuchten Konzentrationsbereich keine Hemmung der Aggregation zustande kommt.

Bei Piroxicam, UK 37,248 und UK 38,485 zeigt sich wiederum eine eindeutige Verlängerung der Zeit $t_{0,5max}$ mit steigender Inhibitorkonzentration.

3.1.2.4. Die Ristocetin-induzierte Aggregation

Im folgenden sind die Einflüsse der Inhibitoren auf die Ristocetin-induzierte Aggregation dargestellt, wobei die Versuchsreihen nur im PRP durchgeführt wurden.

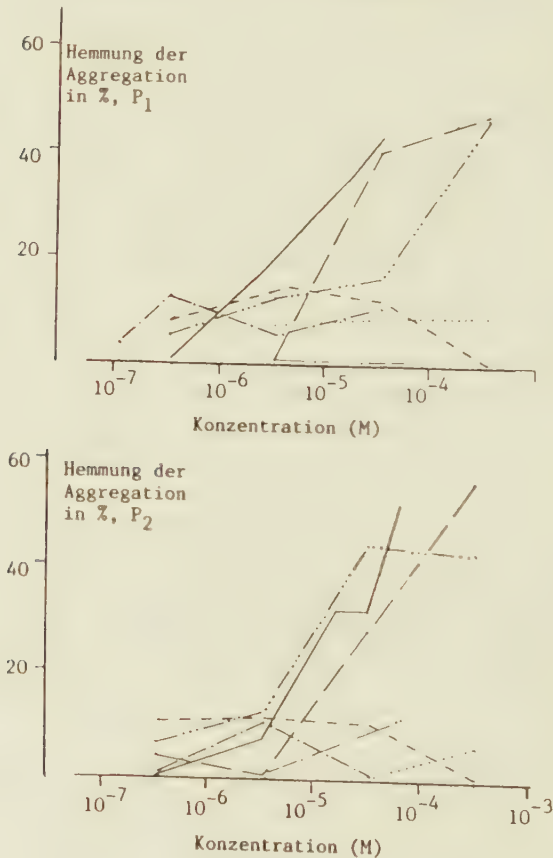


Abb. 40: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf das Ausmaß der Ristocetin-induzierten Aggregation im PRP

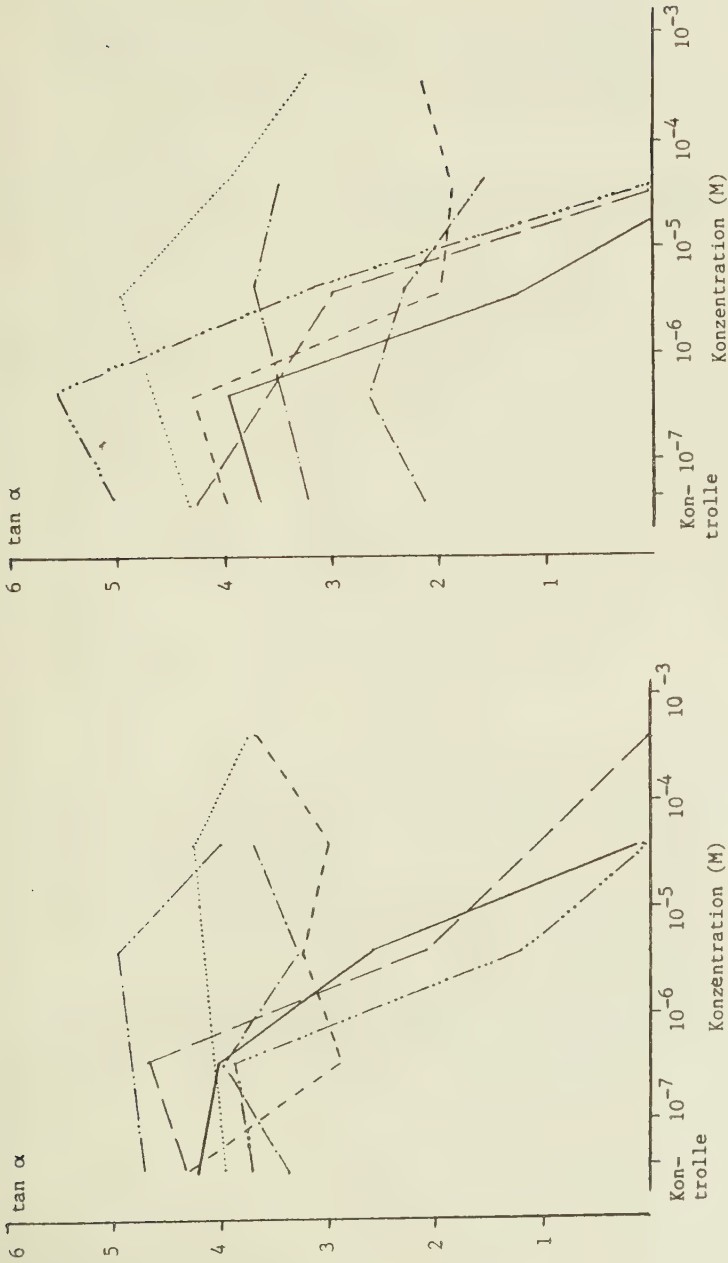


Abb. 41: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit der zweiten Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation

Tab. 7: Einfluß der Inhibitoren und deren Konzentration auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ($\tan \alpha$) der ersten und zweiten Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation und die Reaktionszeit t_0 (in Sekunden), dargestellt am Beispiel Indomethacin

Konzentration	Proband 1			Proband 2		
	t	$\tan \alpha$	$\tan \alpha$	t	$\tan \alpha$	$\tan \alpha$
Kontrolle	2	7,12	4,33	2	7,12	4,33
$3,7 \times 10^{-4}$ M	2	5,67	0,00	2	3,73	0,00
$3,7 \times 10^{-5}$ M	2	5,67	0,00	2	3,73	0,65
$3,7 \times 10^{-6}$ M	2	6,31	3,08	2	4,70	2,15
$3,7 \times 10^{-7}$ M				2	3,27	4,70

Für die Hemmung der Ristocetin-induzierten Aggregation zeichnet sich, zumindest im untersuchten Konzentrationsbereich, eine Teilung in zwei Gruppen ab: Indomethacin, BM 13.177 und Piroxicam bewirken eine Hemmung der Aggregation, während diese bei den anderen getesteten Substanzen ausbleibt (s. Abbildung 40).

Wie Abb. 41 und das Beispiel Indomethacin (Tabelle 7) verdeutlichen, bezieht sich diese inhibitorische Wirkung nur auf die zweite Phase (second wave) der Ristocetin-induzier-

ten Aggregation und ist konzentrationsabhängig. Dies spiegelt sich in einer verringerten maximalen Aggregationsamplitude wie auch in einer Verminderung der maximalen Aggregationsgeschwindigkeit der zweiten Phase der Aggregation wider.

Die Aggregation setzte nach Ristocetinzugabe grundsätzlich sofort ein, d.h. die Zeit t_0 wurde durch die Inhibitoren nicht verändert.

Auch die erste Phase der Aggregation blieb unberührt.

Aggregationsreihen mit der Impedanzmethode wurden bei der Ristocetin-induzierten Aggregation nicht durchgeführt, da die Reproduzierbarkeit der Leerwerte im unveränderten Vollblut nicht zufriedenstellend war.

3.2. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge nach Kollagen-induzierter Aggregation in Gegenwart eines Inhibitors

3.2.1. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge im PRP

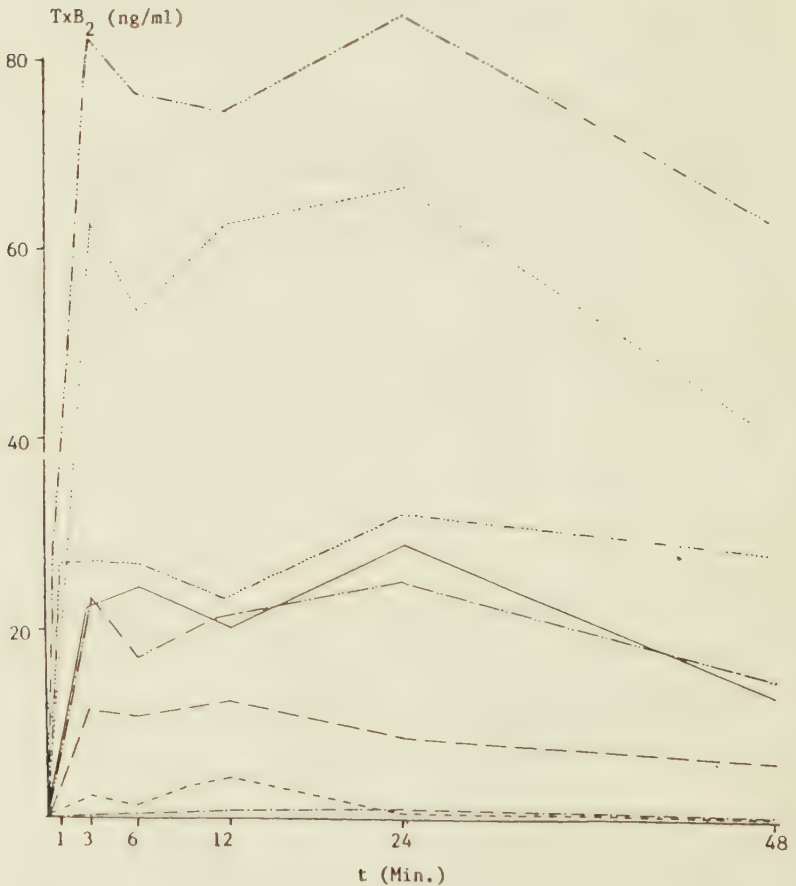


Abb. 42: Bestimmung der freigesetzten TxB₂-Menge im PRP, Proband 1 (ASS = ————; Indomethacin = ————; Piroxicam = ————; UK 37,248 = ————; UK 38,485 = ————; BM 13,177 = ————; Bezafibrat = ————; Kontrollwerte = ————)

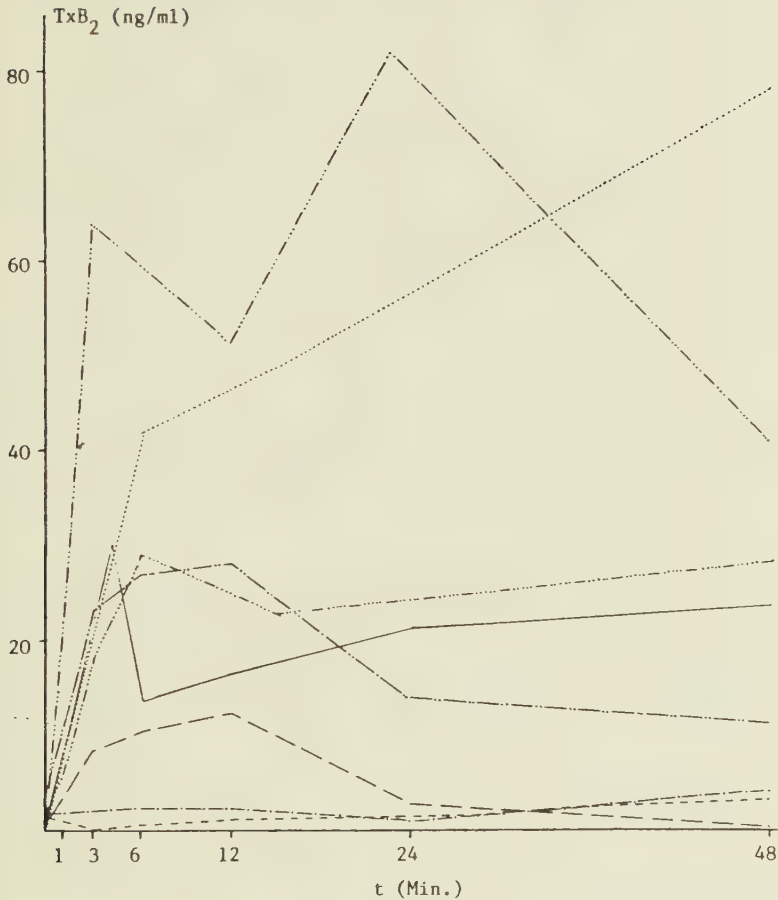


Abb. 43: Bestimmung der freigesetzten TxB₂-Menge im PRP, Proband 2 (Endkonzentrationen der Inhibitoren für alle TxB₂-Bestimmungen: ASS = $7,4 \times 10^{-5}$ M; Indomethacin = $3,7 \times 10^{-6}$ M; Piroxicam = $1,9 \times 10^{-5}$ M; UK 37,248 = $3,7 \times 10^{-4}$ M; UK 38,485 = $3,7 \times 10^{-5}$ M; BM 13.177 = $3,7 \times 10^{-6}$ M; Bezafibrat = $3,7 \times 10^{-4}$ M)

Bei sofortiger Unterbrechung der Reaktion nach Kollagenzugabe (Wert 0 Minuten) sind nur geringste TxB_2 -Mengen in den Proben nachweisbar.

In den ersten drei Minuten nach Kollagenzugabe kommt es in Gegenwart der meisten Substanzen zu einem mehr oder weniger deutlichen Anstieg des TxB_2 -Spiegels. Die Ausnahme bilden UK 37,248 und UK 38,485, die die TxB_2 -Freisetzung über den gesamten gemessenen Zeitraum fast vollkommen unterdrücken.

Die TxB_2 -Werte für Indomethacin steigen in den ersten drei Minuten an, unterliegen bis zur Messung nach 12 Minuten nur geringfügigen Veränderungen und fallen dann wieder ab. Alle gemessenen Werte liegen aber bei beiden Probanden klar unter den Vergleichswerten der Leerwertkurve.

Die Werte für Piroxicam und ASS liegen zum größten Teil unter den Kontrollwerten, wobei die Suppression allerdings deutlich geringer ausfällt als z.B. durch Indomethacin und vor allem die Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485.

Im Gegensatz dazu liegen die in Anwesenheit von BM 13.177 und Bezafibrat ermittelten Thromboxanmengen übereinstimmend bei beiden Probanden über dem Niveau der Kontrollwerte.

Nach längeren Zeitintervallen, vor allem nach 48 Minuten, liegen die gemessenen Werte z.T. niedriger als bei Proben, bei denen die Reaktion nach kürzerer Zeit unterbrochen wurde.

3.2.2. Bestimmung der freigesetzten Thromboxanmenge im Vollblut

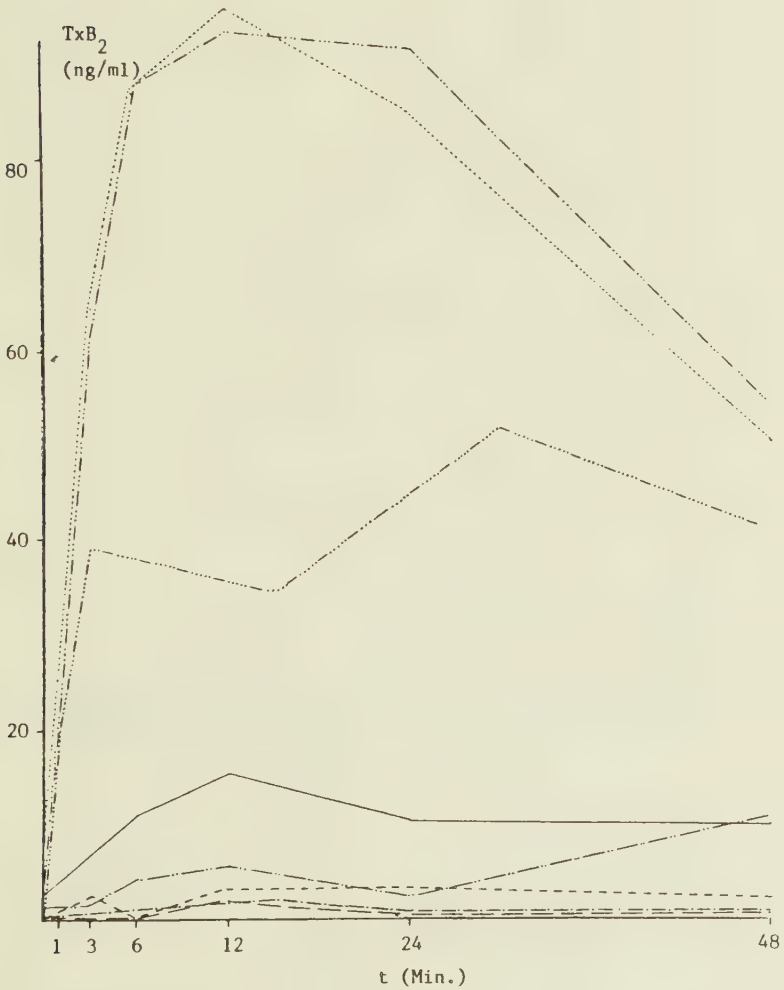


Abb. 44: Bestimmung der freigesetzten TxB_2 -Menge im Vollblut, Proband 1

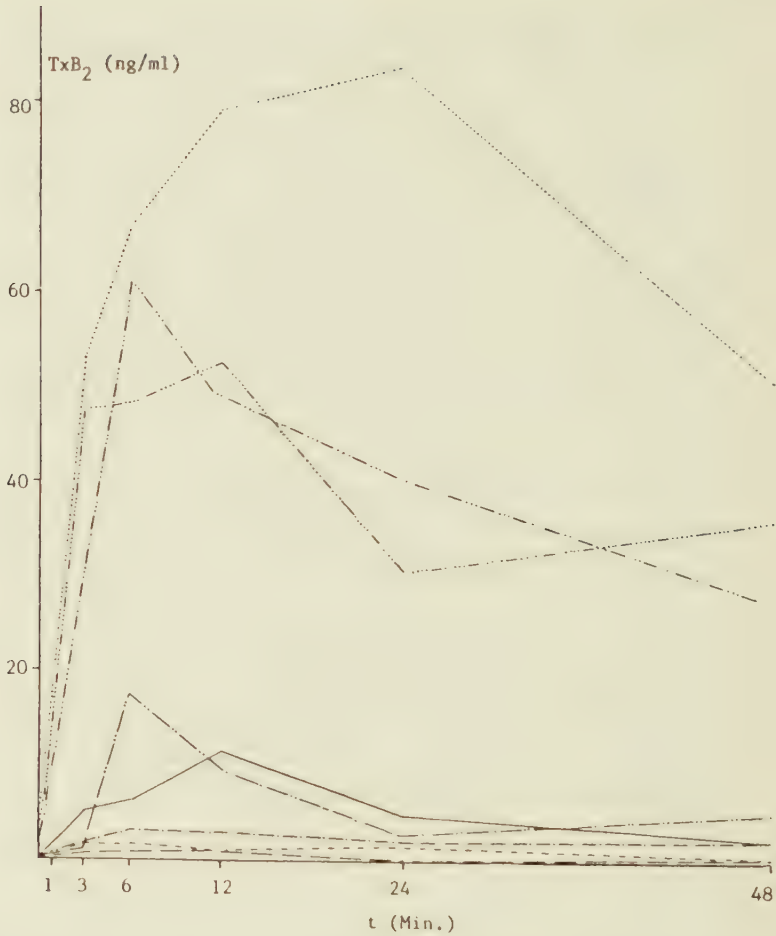


Abb. 45: Bestimmung der freigesetzten TxB_2 -Menge im Vollblut, Proband 2 (ASS = ————; Indomethacin = ————; Piroxicam = ————; UK 37,248 = ————; UK 38,485 = ————; BM 13.177 = ————; Bezafibrat = ————; Kontrollwerte = ————).

Wie schon im PRP zeigt sich auch im Vollblut bei der sofort nach Kollagenzugabe unterbrochenen Freisetzungsreaktion ein geringer oder nicht meßbarer TxB_2 -Spiegel.

Ebenfalls analog zu den Ergebnissen im PRP liegen die in Gegenwart der Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485 gemessenen TxB_2 -Spiegel auf extrem niedrigem Niveau.

Auch die mit Indomethacin inkubierten Proben weisen nur sehr geringe Mengen an freigesetztem TxB_2 auf. Die im plättchenreichen Plasma schon niedrig liegenden Spiegel sinken im Vollblut weiter ab.

Piroxicam zeigt im Vollblut ebenfalls einen ausgeprägteren inhibitorischen Effekt als im PRP, wobei die Höhe der TxB_2 -Spiegel deutlich unter dem für die Leerwerte gefundenen Bereich liegt.

ASS zeigt einen kurzen Anstieg der TxB_2 -Freisetzung nach 6 Minuten bei einem Probanden, liegt aber über den gesamten gemessenen Zeitraum bei beiden Probanden deutlich unter den Werten, die im PRP festgestellt wurden und läßt eine klare inhibitorische Wirkung bezüglich der Höhe des TxB_2 -Spiegels erkennen.

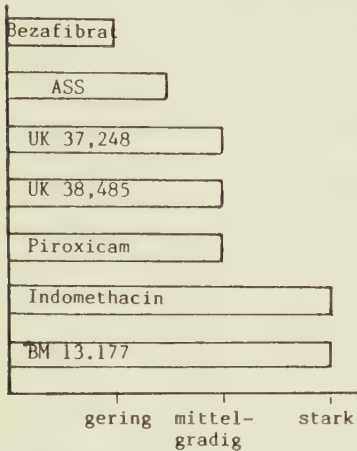
Wie bei den Leerwerten kommt es in Gegenwart von BM 13.177 inden ersten Minuten zu einem starken Anstieg der freigesetzten Thromboxanmenge, ebenso in Gegenwart von Bezafibrat, bei dem wie schon im PRP deutlich höhere TxB_2 - Spiegel gefunden werden als bei den vergleichbaren Kontrollwerten. Wie schon im PRP liegen auch bei den Messungen im Vollblut die TxB_2 -Werte der nach 48 Minuten unterbrochenen Reaktion in Gegenwart von BM 13.177 und Bezafibrat deutlich niedriger als bei früher unterbrochener Reaktion.

Tab.8: Mittelwerte aus der Summe der in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors nach 3, 6, 12, 24, und 48 Minuten gemessenen TxB_2 -Spiegel (in ng/ml)

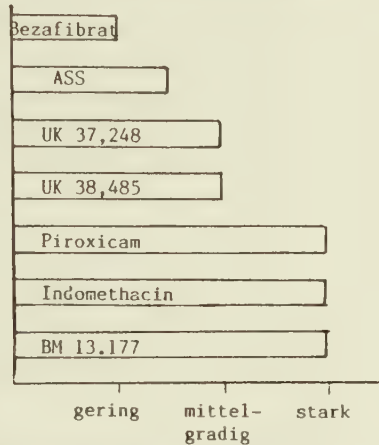
Inhibitor	PRP		Vollblut	
	Proband 1	Proband 2	Proband 1	Proband 2
Kontrollwerte	27,32	25,00	39,52	42,80
ASS	20,04	20,68	5,00	7,20
Indomethacin	9,76	6,80	0,52	0,60
Piroxicam	21,40	21,04	10,72	6,04
UK 37,248	1,32	1,76	3,08	1,28
UK 38,485	0,76	2,32	0,88	2,68
BM 13.177	76,20	57,84	77,80	36,24
Bezafibrat	57,12	48,80	76,44	66,60

3.3. Überblick über die Ergebnisse

- Die Kollagen-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

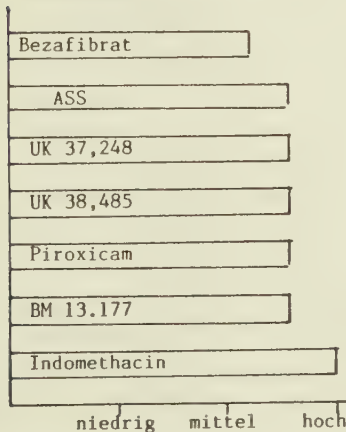


Hemmung der Aggregation im hohen Konzentrationsbereich (PRP)

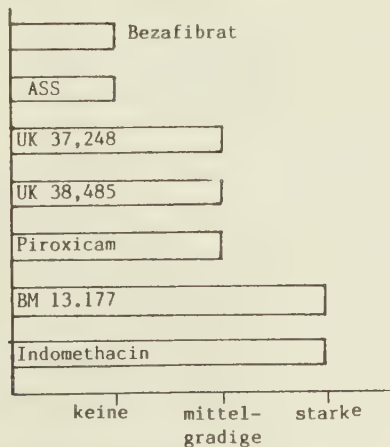


Hemmung der Aggregation im hohen Konzentrationsbereich (Vollblut)

- Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

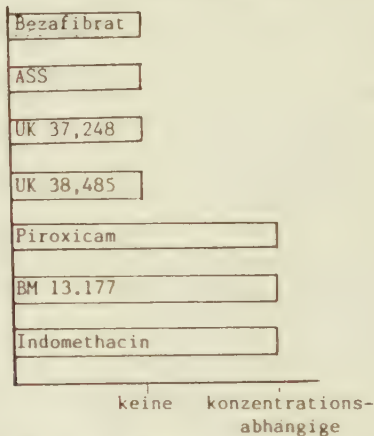


Konzentrationsbereich, in dem völlige Hemmung der Aggregation auftrat (PRP)



Hemmung der Aggregation im hohen Konzentrationsbereich (Vollblut)

- Die ADP-induzierte Aggregation wurde im verwendeten Konzentrationsbereich nicht beeinflusst
- Die Ristocetin-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

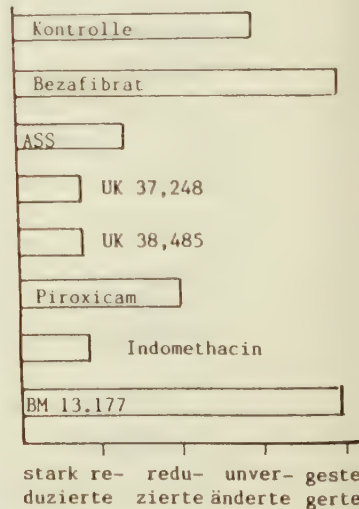


Hemmung der zweiten Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation (PRP)

- Einfluß der Inhibitoren auf die TxB_2 Synthesekapazität nach Kollagen-induzierter Aggregation



Thromboxansynthesekapazität (PRP)



Thromboxansynthesekapazität (Vollblut)

4. Diskussion

4.1. Methodik

Bei allen Ergebnissen muß berücksichtigt werden, daß die Reproduzierbarkeit von Aggregationsversuchen nicht immer sehr gut ist (122) und daher kleine Abweichungen nur mit Vorsicht interpretiert werden dürfen, was gerade bei der in dieser Arbeit vorliegenden geringen Fallzahl nicht übersehen werden darf. Dies bedingt auch, daß die hier dargestellten Resultate zwar eine Tendenz aufzeigen, aber keine statistische Signifikanz beanspruchen können.

Bei der Durchführung der Aggregationsteste wurde versucht, externe Fehlerquellen möglichst auszuschalten. In diesem Zusammenhang war gesichert, daß die Probanden seit mindestens vier Wochen vor Beginn der Versuche ohne Medikation waren.

Nachdem von vielen Untersuchern auf die Bedeutung der Rahmenbedingungen hingewiesen wurde (19,116,127,138), wurde versucht, diese möglichst konstant zu halten. Beispielsweise wurde auf eine Blutentnahme am nüchternen Probanden unter möglichst gleichen Bedingungen sowie eine weitestgehende Konstanz des Zeitintervalls von der Blutentnahme bis zur Aggregation geachtet.

Weiterhin wurde im PRP eine sorgfältige Einstellung der Thrombozytenzahl auf 200 000/ μ l vorgenommen. Sowohl bei der Aggregation im PRP als auch im Vollblut, wo eine lange Probenaufbereitung, die wichtige Zeit kostet, entfällt, wurde die korrekte Temperatur von 37°C sowie die Rührgeschwindigkeit von 1200 rpm überprüft.

Bei der Bewertung von Ergebnissen aus aggregometrischen Arbeiten darf nicht außer Betracht bleiben, daß eine Diskrepanz zwischen in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen besteht, wobei Anteile des natürlichen Milieus wie z.B. Gefäßwand oder rheologische Parameter ausgeklammert werden (121).

Diese lassen sich zwar auch durch die Vollblutaggregometrie

nicht erfassen, aber es können durch die Messung im Vollblut Artefakte vermieden werden, die durch die Aufbereitung des PRP entstehen. Dazu gehört die dafür benötigte Zeit wie auch artefizielle Einflüsse auf die Zusammensetzung der Thrombozytenpopulation durch die Zentrifugation. Ferner kann die Vollblutaggregometrie Aufschlüsse über die Rolle von Erythro- und Leukozyten bei hämostatischen Prozessen erbringen.

Bei der Gegenüberstellung von aggregometrischen Untersuchungen im PRP und Vollblut ist zu beachten, daß die Thrombozytenzahl im Vollblut und im PRP, wo sie auf 200 000/ μ l eingestellt war, erheblich differieren kann. Weiterhin kommt es im Vollblut mit einem Hämatokrit von ca. 40 % und einem Plasmaanteil von ca. 60 % zu einer relativen Konzentrationserhöhung zugegebener Substanzen im Vergleich zum PRP mit identischem Volumen.

4.2. Die aggregationsinduzierenden Substanzen

4.2.1. Kollagen

4.2.1.1. Der Mechanismus der Kollagen-induzierten Aggregation

Die generelle Vorstellung über die Wirkungsweise von aggregationsinduzierenden Substanzen, nämlich die Initiierung der Aggregation durch Anlagerung an einen Rezeptor der Zelle mit konsekutiver Bildung eines Agonist-Rezeptor-Komplexes, Signalwirkung und Veranlassung biochemischer und morphologischer Veränderungen am Thrombozyten, trifft auch für Kollagen zu.

Wenn auch noch keine genauen Einzelheiten über den Mechanismus der Kollagen-induzierten Aggregation bekannt sind, wurde doch die Hypothese aufgestellt, daß die Bindung der α_1 -Ketten des Kollagen, die spezifisch und reversibel an die

intakte Thrombozytenoberfläche erfolgt, ein erster Schritt zur Aggregation sein könnte (29).

An Thrombozyten belegte Bensusan (4), daß Fibronectin zumindest ein Rezeptor für Kollagen an der Membran ist.

Die Kollagen-induzierte Aggregation kann auf zwei Wegen eingeleitet werden. Kommt es zu einer Reaktion mit niedriger dosiertem Kollagen, so wird über eine Aktivierung der Phospholipase A_2 Arachidonsäure freigesetzt und der Prostaglandinmetabolismus in Gang gesetzt (137). Die biosynthetische Kapazität zur TxA_2 -Bildung ist dabei nach Kollagengabe viel höher als zur maximalen Aggregation in vitro notwendig (125). Weiterhin kommt es zur ADP-Freisetzung aus Granula.

Ein zweiter Weg, der durch hochdosierte Kollagenzugabe eingeleitet wird, bewirkt eine ADP-Freisetzung, die unabhängig von den cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 ist, wobei wohl der "Plättchen-aktivierende Faktor" (PAF) eine Rolle spielt (75).

Bei der Kollagen-induzierten Aggregation lagern sich nur einige Thrombozyten an die Kollagenfasern an, während die Mehrzahl der Zellen zunächst freibleibt. An diese Anlagerungsphase, die eine gewisse Zeit benötigt (lag period), schließt sich die Aggregation an, wobei die meisten Zellen durch die aus anderen Thrombozyten freigesetzten Substanzen, vor allem Arachidonsäure-Metaboliten und ADP, denen daher eine Schlüsselrolle zukommt, aggregiert werden.

Weiterhin wurde vermutet, daß Kollagen im Rahmen der Sekretion direkt über die Phosphorylierung bestimmter Proteine oder indirekt über die Beteiligung von Ca-Ionen wirkt (53).

4.2.1.2. Vergleich der Kollagen-induzierten Aggregation im PRP und Vollblut ohne Inhibitorzugabe

Im PRP ließ sich mit einer Kollagenkonzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ eine Aggregation in gut reproduzierbarer Weise auslösen. Außerdem war im PRP nach Kollagenzugabe die Verzögerungsphase (lag period) zu beobachten, während der es zu einer Abnahme der Lichttransmission kam, was auf die morphologischen Veränderungen der Zellen in dieser Phase (shape change) zurückzuführen sein dürfte. Danach folgte durchschnittlich nach 60-100 Sekunden das Einsetzen der Aggregation in einem monophasischen Verlauf. Sie war nach ca. drei bis vier Minuten abgeschlossen.

Auch im Vollblutaggregometer ließ sich durch eine Kollagenkonzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ eine gut reproduzierbare Aggregation auslösen. Ebenfalls war nach Kollagenzugabe eine Latenzperiode bis zum Einsetzen der Aggregation zu beobachten, die bei ca. 60-140 Sekunden lag. Diese kann damit begründet werden, daß im Vollblutaggregometer zuerst größere Aggregate entstehen, die sich dann erst an der Elektrode niederschlagen und eine Widerstandserhöhung bewirken (61). Ob außerdem auch die Faktoren, die für die Latenzphase im PRP verantwortlich sind, eine Rolle spielen, ist noch ungeklärt. Ein Fehlen der Information über die morphologischen Veränderungen der Thrombozyten bei Messungen mit der Impedanzmethode wird diskutiert (26). Trotzdem kam es während der Latenzzeit bei den Kontrollwerten wie auch nach Inhibitorzugabe zu einer Abweichung des Schreibers von der Basislinie nach oben und damit zu einer Impedanzabnahme, bevor die Aggregation einsetzte. Dies ist möglicherweise durch die Interaktion von Erythrozyten im Elektrodenareal zu erklären (62). Allerdings zeigt sich eine Impedanzabnahme auch bei der Messung der Aggregation im PRP mit der Impedanzmethode (eigene, hier nicht dargestellte Ergebnisse bei Aggregationsmessungen im PRP mit der Impedanzmethode).

4.2.1.3. Die Kollagen-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

Durch alle Inhibitoren wurde die Kollagen-induzierte Aggregation im PRP und Vollblut konzentrationsabhängig gehemmt. Dabei blieb die Zeit t_0 bis zum Einsetzen der Aggregation unverändert, aber die Aggregationsgeschwindigkeit, gemessen als $\tan \alpha$, nahm mit steigender Inhibitorkonzentration ab, und die Hemmung der maximalen Aggregation deutlich zu. Dies zeigt, daß offenbar die Kollagen-induzierte Aggregation initial von einer Modulation des Arachidonsäure-Metabolismus nicht beeinflusst wird, dann aber der sich normalerweise selbst unterhaltende Prozeß von Aggregation und TxA_2 -Produktion durch die Inhibitoren konzentrationsabhängig beeinflusst wird, was sich in einer Verlangsamung der maximalen Aggregationsgeschwindigkeit und einer Hemmung der maximalen Aggregation ausdrückt.

Durch die Cyclooxygenase-Inhibitoren Indomethacin und Piroxicam, die auch die TxA_2 -Synthese stark hemmen, und durch den Rezeptorantagonisten BM 13.177 wurde die Aggregation stark gehemmt. Durch die Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485, die die Thromboxan-Synthesekapazität fast vollständig aufheben, kam es zu einer schwächeren Inhibierung der Aggregation. Dies belegt die wichtige Rolle der Arachidonsäure-Metaboliten. Erstens ist offensichtlich TxA_2 für die Kollagen-induzierte Aggregation von Bedeutung. Zweitens sind im Fall einer Blockade der TxA_2 -Synthetase auch die cyclischen Endoperoxide in der Lage, eine Aggregation auszulösen.

4.2.2. ADP

4.2.2.1. Der Mechanismus der ADP-induzierten Aggregation

Obwohl Gaarder schon 1961 feststellte, daß ADP aus Erythrozyten zur Thrombozytenaggregation führt (45), und Born als erster einen spezifischen Rezeptor an der Membran postulierte (16), bestehen nach wie vor viele Unklarheiten über den Wirkungsmechanismus der ADP-induzierten Aggregation.

Bei der Bindung von ADP an Zellrezeptoren ist offenbar die Freilegung von Fibrinogenrezeptoren an der Thrombozytenoberfläche (3) sowie eine Veränderung des Ionenflusses durch die Membran (42) von Bedeutung.

Wird die Aggregation durch niedrige Konzentrationen von ADP ausgelöst ($0,2-1 \mu\text{Mol/l}$), so kommt es zu morphologischen Formveränderungen der Zellen (shape change) und bei Anwesenheit von Ca-Ionen und Fibrinogen zu einer reversiblen Aggregation mit anschließender Desaggregation (141).

In etwas höherer Dosis löst ADP zunächst eine erste Phase der Aggregation aus, bei der es auch zur Freisetzungsreaktion kommt. Dabei freigesetzte Substanzen, vor allem endogenes ADP und – vermutlich mit weit geringerer Bedeutung – TxA_2 bewirken eine zweite Phase der Aggregation, die irreversibel ist. Da die bei der ADP-induzierten Aggregation gefundenen TxB_2 -Mengen nur gering sind, läuft diese offenbar relativ unabhängig von der Thromboxansynthese ab (125).

Bei noch höherer ADP-Dosis kommt es zu einem Übergang der ersten und der zweiten Phase der Aggregation in der Kurve, die eine Abgrenzung unmöglich macht.

4.2.2.2. Vergleich der ADP-induzierten Aggregation im PRP und Vollblut ohne Inhibitorzugabe

Im PRP ließ sich mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ eine gut reproduzierbare Aggregation auslösen. Eine zweite

Phase der Aggregation ließ sich dabei von einer ersten in vielen Fällen nicht abgrenzen, weshalb eine getrennte Auswertung nicht möglich war.

Die Aggregation setzte stets sofort nach Zugabe der aggregationsinduzierenden Substanz ein und war nach 90-120 Sekunden abgeschlossen.

Auch im Vollblut ließ sich innerhalb der Versuchsreihen eine gut reproduzierbare Aggregation auslösen. Im Gegensatz zur Aggregation im PRP war dabei aber eine Latenzperiode von ca. 45-60 Sekunden bis zum Beginn der Aggregation zu beobachten. Ebenso wie bei der Kollagen-induzierten Aggregation könnte dies darauf zurückzuführen sein, daß sich zunächst Thrombozytenaggregate bilden, die sich dann erst an der Elektrode anlagern und die Impedanzänderung bewirken.

Bei beiden Probanden ergaben sich allerdings in Vollblut z.T. deutliche Schwankungen von Tag zu Tag bezüglich der zur Aggregationsauslösung benötigten ADP-Menge (1-5 µg/ml). Eine mögliche Erklärung für Schwankungen in diesem Bereich könnte eine Desensibilisierung der Thrombozyten durch aus Erythrozyten bei der Blutentnahme freigesetztes ADP sein. Wie bei der Kollagen-induzierten Aggregation trat in der Latenzphase eine Abweichung des Schreibers von der Grundlinie auf, die durch den Kontrolldrehkopf ausgeglichen wurde, bis die Aggregation mit Impedanzzunahme einsetzte.

Wie schon im PRP konnte im verwendeten Konzentrationsbereich auch im Vollblut keine zweite Phase der Aggregation (second wave) abgegrenzt werden.

Insgesamt zeigte sich für die Kollagen- und ADP-induzierte Aggregation im Kurvenverlauf im PRP und Vollblut ein ähnliches Bild.

4.2.2.3. Die ADP-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

Durch keinen der Inhibitoren wurde die ADP-induzierte Aggregation im PRP oder Vollblut beeinflusst. Möglicherweise wird bei einer anderen ADP-Konzentration mit deutlicher Abgrenzbarkeit der zweiten Phase der Aggregation ein Einfluß von Inhibitoren auf diese erkennbar (87,101). Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen jedoch die geringe Bedeutung von TxA_2 oder der cyclischen Endoperoxide für die ADP-induzierte Aggregation.

4.2.3. Arachidonsäure

4.2.3.1. Der Mechanismus der Arachidonsäure-induzierten Aggregation

Der Verwendung von Arachidonsäure als aggregationsinduzierender Substanz liegt die Annahme zugrunde, daß auch exogene Arachidonsäure von Thrombozyten zu cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 metabolisiert wird und damit zur Aggregation führt. Neben der TxA_2 -Bildung kommt es durch Arachidonsäure-Zugabe auch zur Freisetzung von Substanzen thrombozytärer Granula, z.B. ADP (74). In welcher Beziehung diese Substanzen zueinander stehen, ist allerdings nicht genau geklärt. Es wurde vermutet, daß TxA_2 durch Freisetzung von ADP die Aggregation auslösen konnte. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß die Arachidonsäure-induzierte Aggregation auch unabhängig von der ADP-Sekretion ablaufen kann (22).

Auch wenn ADP eine gewisse Rolle spielen mag, scheint doch den cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation eine Schlüsselrolle zuzukommen.

4.2.3.2. Vergleich der Arachidonsäure-induzierten Aggregation in PRP und Vollblut

Die Aggregation ließ sich im PRP mit einer Arachidonsäure-Konzentration von 400 µg/ml gut reproduzieren. Nach einem kurzen Abfall der Transmission kam es zu einem monophasischen Kurvenverlauf, wobei die Aggregation nach ca. 30 Sekunden einsetzte und nach ca. drei bis vier Minuten abgeschlossen war.

Bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation im Vollblut (s.2.1.1.3.2.) waren die jeweiligen Kontrollwerte bei einer Konzentration von 350 µg/ml für beide Probanden gut reproduzierbar. Auch hier war eine Latenzzeit von ca. 60 Sekunden zu beobachten, während der es wieder zu einer vorübergehenden Impedanzabnahme kam.

Der Aggregationsvorgang erreichte nach 12-15 Minuten sein Maximum.

4.2.3.3. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

Durch alle Inhibitoren außer ASS und Bezafibrat im Vollblut wurde die Arachidonsäure-induzierte Aggregation gehemmt. Wie bei der Kollagen-induzierten Aggregation unterstreicht die deutliche Wirkung des stärksten Cyclooxygenase-Hemmers Indomethacin und des Rezeptorantagonisten BM 13.177, daß auch bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation TxA_2 bzw. den cyclischen Endoperoxiden eine Bedeutung zukommt.

Während durch ASS und Bezafibrat im PRP im verwendeten Konzentrationsbereich noch eine Wirkung erkennbar ist, fehlt diese bei den Aggregationstesten im Vollblut ganz, obwohl hier eine relativ höhere Inhibitorkonzentration vorliegen könnte (s. 4.1.). Ob der fehlende inhibitorische Effekt auf proaggregatorische Komponenten im Vollblut oder andere metabolische Einflüsse zurückzuführen ist, bleibt offen.

4.2.4. Ristocetin

4.2.4.1. Der Mechanismus der Ristocetin-induzierten Aggregation

Auch der Mechanismus der Ristocetin-induzierten Aggregation ist nicht völlig geklärt (32,64,65,70). Collier (32) stellte die - allerdings nicht unumstrittene - Hypothese auf, daß die Thrombozyten, die sich normalerweise durch elektrostatische Abstoßungskräfte nicht genügend annähern können, um durch von Willebrand-Faktor mittels Brückenschlag verbunden zu werden, durch das positiv geladene Ristocetin in ihrer Nettoladung reduziert werden. Der dadurch mögliche engere Kontakt könnte dem von Willebrand-Faktor die Brückenbildung und Aggregation ermöglichen.

Kao konnte spezielle Faktor VIII-R:WF-Rezeptoren an menschlichen Thrombozyten nachweisen (67). Ferner wurde belegt, daß Ristocetin die Adenylatcyclase in Thrombozyten stark hemmt und damit den cAMP-Spiegel beeinflußt (68).

4.2.4.2. Die Ristocetin-induzierte Aggregation im PRP ohne Inhibitorzugabe

Die Aggregation war im PRP durch eine Konzentration von 600 µg/ml regelmäßig und gut reproduzierbar auszulösen. Sie begann sofort nach Aggreganzzugabe. Die Aggregation nahm einen zweiphasigen Verlauf und war nach ca. zwei bis drei Minuten abgeschlossen.

Im Vollblut wurde versucht, einheitliche Leerwerte zu erhalten. Im Gegensatz zum Verlauf im PRP trat dabei eine gewisse Latenzphase von ca. 60 Sekunden auf, die auch bei den anderen aggregationsinduzierenden Substanzen im Vollblut zu beobachten war. Bei Verwendung gleicher Endkonzentrationen Ristocetin traten dabei im Vollblut wiederholt innerhalb von Minuten große Schwankungen bezüglich der Amplitude der

Aggregation auf, die noch unerklärt sind. Daher waren Ristocetin-induzierte Untersuchungen im Vollblut nicht sinnvoll.

4.2.4.3. Die Ristocetin-induzierte Aggregation in Gegenwart der Inhibitoren

Durch keinen der Inhibitoren wurde die Zeit t_0 bis zum Einsetzen der Aggregation oder deren erste Phase beeinflusst. Daher ist für diese Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation keine Bedeutung der cyclischen Endoperoxide bzw. des TxA_2 abzuleiten. Dagegen trat bei der zweiten Phase der Aggregation eine dosisabhängige Hemmung durch die stärkeren Cyclooxygenase-Hemmer Indomethacin und Piroxicam sowie durch den Rezeptorantagonisten BM 13.177 auf.

Unter UK 37,248, UK 38,485, ASS und Bezafibrat war keine Hemmung der zweiten Phase erkennbar. Daher ist offenbar die zweite Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation von den cyclischen Endoperoxiden oder TxA_2 abhängig, kann aber bei Blockade der TxA_2 -Synthetase auch durch die cyclischen Endoperoxide allein ablaufen.

Da Ristocetin auch ein hochwirksamer Inhibitor der Adenylatcyclase ist (68), kommt es möglicherweise bei der zweiten Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation zur Synthese von cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 , die eine Hemmung der Adenylatcyclase und eine Verminderung des cAMP mit konsekutiver Aggregation nach sich zieht. Im Fall einer Blockade der Wirkung der Arachidonsäure-Metaboliten durch Hemmung der Cyclooxygenase oberhalb einer gewissen Schwelle und damit der Bildung von cyclischen Endoperoxiden bzw. TxA_2 oder durch Blockade der Rezeptoren könnte auch eine Hemmung der Adenylatcyclase und Senkung des cAMP-Spiegels entfallen, was eine Hemmung der Aggregation zur Folge hätte.

Dazu müßte die Beziehung zwischen der zweiten Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation, TxA_2 und cAMP genauer untersucht werden.

4.3. Die Inhibitoren

4.3.1. Acetylsalicylsäure (ASS)

4.3.1.1. Wirkungsweise von ASS und Probleme der klinischen Anwendung als Thrombozytenaggregationshemmer

Eine Verminderung der Thrombozytenaggregation durch ASS ist schon seit Jahren bekannt. 1971 zeigte Smith (128) eine Hemmung der Prostaglandinsynthese als Wirkungsmechanismus von ASS. Dieser konnte als eine Inaktivierung der Cyclooxygenase durch Acetylierung einer NH_2 -Gruppe von Serin weiter konkretisiert werden (118,119). Die daraus resultierende verminderte Bildung der cyclischen Endoperoxide und von TxA_2 scheint eine plausible Erklärung für die antiaggregatorische Wirkung von ASS darzustellen. Da Thrombozyten als kernlose Zellen keine neuen Enzyme synthetisieren können und die Inaktivierung irreversibel ist, bleibt die Hemmung für die restliche Lebensdauer des Thrombozyten bestehen (43).

Allerdings wird in vivo auch die Cyclooxygenase der Endothelzellen gehemmt. Durch Metabolisierung der Arachidonsäure wird in Endothelzellen das antiaggregatorisch wirksame PGI_2 gebildet. Dessen Hemmung wirkt aufgrund der dann fehlenden antiaggregatorischen und vasodilatatorischen PGI_2 -Wirkung thrombogen. Allerdings sind Endothelzellen kernhaltig und können nach Unterschreiten des Wirkspiegels von ASS die irreversible Enzymhemmung durch neue Enzymsynthese umgehen (63,123).

Neue Konzepte einer niedrig dosierten Therapie (low dose) mit ASS, die eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase in den Thrombozyten, aber nur eine kurzdauernde in den Endothelzellen bewirkt, sollen insgesamt eine antiaggregatorische Wirkung zur Folge haben.

Diese theoretische Vorstellung ist umstritten (112), wird von der großen Mehrzahl der Untersucher aber bestätigt (1,43,63,86,123,142).

Außerdem wurde wiederholt vermutet, daß ASS in vivo zusätzlich über Mechanismen wirken könnte, die nicht mit einer Hemmung der Cyclooxygenase in Zusammenhang stehen. Möglicherweise modifiziert ASS durch Bindung an Oberflächenproteine Thrombozytenrezeptoren oder sie greift in andere, noch weniger erforschte Stoffwechselschritte des Arachidonsäure-Metabolismus ein, z.B. den Lipoxigenase-Stoffwechselweg (20,35).

Über die optimale klinische Dosierung besteht daher heute noch Unklarheit, zumal sich Aussagen über Dosis-Wirkungs-Beziehungen z.T. widersprechen und vermutlich Unterschiede im Hinblick auf die Wirkung im arteriellen und venösen Bereich sowie individueller und geschlechtsspezifischer Art bestehen (21,33,71,72,73,102).

4.3.1.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von ASS: Einfluß und Folgerungen

ASS bewirkt bei der Kollagen-induzierten Aggregation eine deutliche, konzentrationsabhängige Hemmung sowohl im PRP als auch im Vollblut. Dies gilt für das Ausmaß der maximalen Aggregation wie auch für die maximale Aggregationsgeschwindigkeit. Dabei bleibt die Wirkung im Vollblut auf die höchste Konzentration, dort aber klar erkennbar, beschränkt. Es handelt sich daher eventuell um ein Schwellenphänomen, bei dem eine nur wenig höhere Dosierung eine starke Wirkungszunahme zur Folge hat. Allerdings ist die Wirkung von ASS in allen Konzentrationen im PRP wie im Vollblut bei beiden Probanden schwächer als die der beiden anderen Hemmstoffe der Cyclooxygenase, Piroxicam und Indomethacin.

Während sich ASS bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation im PRP nicht wesentlich in seiner Wirkung von den anderen geprüften Substanzen unterscheidet, fehlt ein inhibitorischer Effekt auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut völlig. Dies steht dabei im

Widerspruch zu Untersuchungen ex vivo nach oraler ASS-Gabe (114), wonach es zu einer Hemmung der Aggregation kommt. Ob analog den Resultaten bei der Kollagen induzierten Aggregation eine noch höhere ASS-Konzentration zu einer Hemmung geführt hätte, wurde nicht geprüft.

Einflüsse auf die ADP-induzierte Aggregation sind im PRP wie im Vollblut im verwendeten Konzentrationsbereich nicht erkennbar.

Dies ließe sich mit einer geringen Bedeutung der Prostaglandin-Metaboliten bei der ADP-induzierten Aggregation erklären, steht aber im Gegensatz zu anderen Untersuchern, die eine Hemmung der zweiten Phase der ADP-induzierten Aggregation fanden (87,101).

Da die in den hier vorliegenden Untersuchungen verwendete ADP-Konzentration keine zweiphasige Aggregationsantwort hervorrief, kann zur isolierten Beeinflussung der zweiten Phase der Aggregation nicht Stellung genommen werden.

Im Anschluß an die Aggregation trat keine Desaggregation auf.

Auch die Ristocetin-induzierte Aggregation wurde durch ASS nicht beeinflusst. Dies spricht einerseits gegen eine Bedeutung von cyclischen Endoperoxiden oder TxA_2 bei der Ristocetin-induzierten Aggregation. Andererseits wurde auch die Kollagen-induzierte Aggregation, für die eine Bedeutung von cyclischen Endoperoxiden bzw. TxA_2 mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, nur in den höchsten verwendeten ASS-Konzentrationen beeinflusst. Auch zeigt die TxA_2 -Synthese (s. unten), daß diese durch die hier verwendeten ASS-Konzentrationen nur wenig beeinflusst wurde. Daher kann eine Hemmung der Ristocetin-induzierten Aggregation durch höhere ASS-Konzentrationen als Hinweis auf eine Bedeutung von cyclischen Endoperoxiden bzw. TxA_2 für die Ristocetin-induzierte Aggregation nicht ausgeschlossen werden.

Die TxB_2 -Werte im PRP liegen relativ geringfügig, z.T. sogar überhaupt nicht unter dem für die Kontrollwerte ermittelten Bereich. Im Vollblut dagegen sind die Werte der beiden

Probanden eindeutig niedriger als die Kontrollwerte (s. Abb. 42-45). Analog zeigt sich bei der verwendeten Konzentration eine starke Hemmung der Aggregation im Vollblut, eine deutlich schwächere im PRP. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der Synthese von cyclischen Endoperoxiden bzw. TxA_2 und der Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation hin.

Die Ergebnisse der Kollagen-induzierten Aggregation und der TxB_2 -Bestimmung sprechen für die Theorie der Schwellenkonzentration: Während im niedrigen Konzentrationsbereich eine wirksame Aggregationshemmung nicht stattfand, wird im höheren Bereich, einhergehend mit deutlich erniedrigter TxB_2 -Synthesekapazität zumindest im Vollblut, eine klare inhibitorische Wirkung erzielt.

✓

4.3.2. Indomethacin

4.3.2.1. Wirkungsweise von Indomethacin

Der Wirkungsmechanismus von Indomethacin ähnelt in gewisser Weise dem von ASS. Auch Indomethacin hemmt die Cyclooxygenase, und zwar im Gegensatz zu ASS reversibel. Weiterhin besteht ein hemmender Einfluß auf die Thromboxansynthetase, der aber gegenüber der inhibitorischen Wirkung auf die Cyclooxygenase deutlich in den Hintergrund tritt (91,109).

Genaue Einzelheiten über die Wirkungsweise von Indomethacin sind nicht bekannt, allerdings gibt es Hinweise, daß eine Wirkung über die gleiche Substratbindungsstelle vorliegt wie bei ASS, da es dessen Langzeitwirkung auf die Aggregation in vivo verhindert (82).

4.3.2.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Indomethacin: Einfluß und Folgerungen

Durch Indomethacin kommt es im PRP und Vollblut zu einer starken Herabsetzung der Kollagen-induzierten Aggregation. Diese ist dosisabhängig und bezieht sich auf das Ausmaß der maximalen Aggregation wie auch auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit.

Dabei ist Indomethacin eine der beiden am stärksten antiaggregatorisch wirkenden Substanzen und zeigt auch die höchste Wirkung unter den Cyclooxygenasehemmern. Dies wird auch von anderen Untersuchern bestätigt (107).

Dabei besteht im Vollblut noch eine Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve gegenüber dem PRP (s. Abb. 30), die sich möglicherweise dadurch erklären läßt, daß im Vollblut hamatokritbedingt eine relativ höhere Inhibitorkonzentration entsteht (s. 4.1.). Weiterhin könnte die Thrombozytenzahl im Vollblut höher liegen als im auf 200 000/ μl eingestellten PRP.

Auch bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation steht die inhibitorische Wirkung von Indomethacin im PRP, vor allem aber im Vollblut an führender Stelle, wobei sich wieder eine dosisabhängige Hemmung zeigt.

Diese Befunde stehen in Einklang mit der zentralen Bedeutung von cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 bei der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation.

Die ADP-induzierte Aggregation wurde durch Indomethacin nicht beeinflusst. Dies bestätigt die These, daß die cyclischen Endoperoxide bzw. TxA_2 für die ADP-induzierte Aggregation keine erhebliche Bedeutung haben. Andererseits könnten die Resultate auch durch die ADP-Konzentration bedingt sein, da nach in vivo-Gabe von Indomethacin eine Hemmung der zweiten Phase der ADP-induzierten Aggregation gefunden wurde (36).

Für die Ristocetin-induzierte Aggregation ergab sich im PRP eine Hemmung durch Indomethacin im oberen Konzentrationsbereich ($3,7 \times 10^{-4} \text{ M} - 3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$). Diese Hemmung war dosisabhängig und ausschließlich auf die zweite Aggregationsphase bezogen. Dies spricht für eine Bedeutung der Prostaglandin-Metaboliten bei der zweiten Phase der Aggregation.

Die für Indomethacin erhobenen Befunde und daraus abgeleiteten Folgerungen werden durch die Ergebnisse der TxB_2 -Bestimmung nach Kollagen-induzierter Aggregation unterstrichen. Durch Indomethacin kommt es zu einer deutlichen Reduzierung der TxB_2 -Synthese im PRP, wobei diese im Vollblut noch stärker ausfällt und praktisch keine TxB_2 -Synthese mehr stattfindet. Dies unterstreicht in Verbindung mit den Ergebnissen der Aggregationsteste in Gegenwart von Indomethacin zusätzlich den Zusammenhang zwischen der Hemmung der Bildung von cyclischen Endoperoxiden bzw. TxA_2 und der Hemmung der Aggregation.

Bezüglich der PGI_2 -Produktion durch Leukozyten (13) liegt die Vermutung nahe, daß diese entweder durch Indomethacin - zumindest im untersuchten Konzentrationsbereich - nicht maßgeblich beeinflusst wird, oder daß ihr keine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Hämostase zukommt.

Da die Aggregationshemmung im Vollblut stärker war als im PRP, ergeben sich keine Hinweise auf die Bedeutung proaggregatorischer Komponenten im Vollblut wie z.B. PAF (5) oder aus Erythrozyten freigesetztes ADP (45).

4.3.3. Piroxicam

4.3.3. Wirkungsweise von Piroxicam

Piroxicam, ebenfalls ein nicht-steroidales entzündungshemmendes Medikament, greift auch in die Prostaglandin-Synthese ein (27) und ist wie Indomethacin ein reversibler

Inhibitor der Cyclooxygenase. Dabei besteht kein oder nur geringer Einfluß auf die Phospholipase, die TxA_2 - oder PGI_2 -Synthetase sowie die Lipoxygenase (144).

4.3.3.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Piroxicam: Einfluß und Folgerungen

Sowohl im PRP als auch im Vollblut kommt es durch Piroxicam zu einer dosisabhängigen Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation. Auch hier betrifft sie das Ausmaß der maximalen Aggregation wie auch die maximale Aggregationsgeschwindigkeit. Dabei ist die antiaggregatorische Wirkung geringer als die des reversiblen Cyclooxygenasehemmers Indomethacin, aber stärker als die von ASS. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Untersucher (46).

Die Dosiswirkungskurve ist ähnlich wie bei Indomethacin im Vollblut gegenüber dem PRP nach links verschoben.

Auch bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation zeigt sich im PRP wie im Vollblut eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Aggregation durch Piroxicam. Diese ist im Gegensatz zur Aggregation in Gegenwart von ASS klar festzustellen, aber nicht so stark ausgeprägt wie die antiaggregatorische Wirkung des Indomethacin. Wie auch bei den anderen Cyclooxygenasehemmern tritt dabei im Vollblut im Gegensatz zum PRP eine abgestufte Hemmung auf.

Schon hier bietet sich wieder ein Eingriff in den Prostaglandin-Stoffwechsel als Erklärung für die inhibitorische Wirkung an.

Die ADP-induzierte Aggregation wurde durch Piroxicam nicht gehemmt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Gaynor überein (46), während nach in vivo-Gabe von Piroxicam eine Hemmung der zweiten Phase der ADP-induzierten Aggregation, die hier nicht untersucht wurde, gefunden wurde (140). Diese

Diskrepanz zwischen in vivo- und in vitro-Untersuchungen ist unerklärt, deutet aber an, daß die Wirkung in vivo aufgenommener Substanzen nur zum Teil durch in vitro-Untersuchungen nachvollzogen werden kann.

Auch auf die Ristocetin-induzierte Aggregation übte Piroxicam eine inhibitorische Wirkung aus, die wie bei Indomethacin dosisabhängig war und ausschließlich auf die zweite Phase der Aggregation beschränkt.

Die Hemmung der Thromboxansynthese durch Piroxicam im PRP war nicht sehr ausgeprägt gegenüber den Kontrollwerten, im Vollblut dagegen wurde die Thromboxansynthese stark inhibiert. In Verbindung mit der stärkeren Hemmung der Kollagen-induzierte Aggregation im Vollblut spricht dies für eine Bedeutung der cyclischen Endoperoxide bzw. von TxA_2 bei der Aggregation.

Die im Vollblut gegenüber dem PRP bei der Kollagen-induzierten Aggregation nach links verschobene Dosiswirkungskurve (s. Abb. 30) kann auch in Gegenwart von Piroxicam auf eine hämatokritbedingte relative Erhöhung der Inhibitorkonzentration im Vollblut zurückzuführen sein. Auf jeden Fall sind auch hier keine Einflüsse proaggregatorischer Komponenten des Vollbluts aufgrund von PAF, ADP oder einer möglichen PGI_2 -Synthesehemmung von Blutzellen erkennbar.

4.3.4. UK 37,248 (Dazoxiben)

4.3.4.1. Wirkungsweise von UK 37,248

Wegen der großen Bedeutung von TxA_2 für die Aggregation wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Bildung selektiv zu hemmen. Dabei wurde entdeckt, daß Imidazol bzw. gewisse Derivate dazu in der Lage sind (92,99). Auch UK 37,248 gehört zu den Imidazolderivaten und wirkt selektiv auf die Thromboxansynthetase, wobei die Cyclooxygenase praktisch nicht gehemmt wird (83). Auch die Lipoxigenase bleibt

unbeeinflusst (12). Die Eigenschaften von UK 37,248 wurden bisher tierexperimentell untersucht und die Substanz wird klinisch erprobt.

Die therapeutische Vorstellung geht dabei von einer aggregationshemmenden Wirkung durch Verhinderung der TxA_2 -Bildung aus.

Allerdings wird die Entstehung der cyclischen Endoperoxide nicht inhibiert. Einerseits ist ihr proaggregatorischer Effekt bekannt, andererseits wird von Untersuchern darauf hingewiesen, daß die cyclischen Endoperoxide, die in den Thrombozyten bei Hemmung der Thromboxansynthetase vermehrt anfallen und freigesetzt werden, von den Endothelzellen oder Leukozyten aufgenommen und zu PGI_2 umgewandelt werden können (39,40,83,85,136).

Andere Untersucher dagegen sprechen den Thromboxansynthetase-Inhibitoren eine thrombozytenfunktionshemmende Wirkung in vivo allerdings auch ab (80).

Ob eine aggregationsfördernde Wirkung der cyclischen Endoperoxide dabei unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung ist oder erst bei Blockade der Thromboxansynthese auftritt, ist nicht geklärt (94,120).

Weiterhin ist auch bei selektiver Blockade der Thromboxansynthetase eine Umleitung des Prostaglandin-Metabolismus mit folgendem Anstieg der antiaggregatorischen PGE_2 und PGD_2 möglich, wodurch es zu einem Anstieg der cAMP-Spiegel damit zur Thrombozytenfunktionshemmung kommen kann (12,39,130).

4.3.4.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von UK 37,248

UK 37,248 hemmte die Kollagen-induzierte Aggregation im PRP und Vollblut dosisabhängig im Bezug auf die maximale Aggregation und die maximale Geschwindigkeit des Aggregationsablaufs. Die Wirkung der starken Inhibitoren wie z.B.

Indomethacin wurde dabei allerdings nicht erreicht. Außerdem ergab sich eine Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve im Vollblut gegenüber dem PRP (s. Abb. 31).

Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation war auch in Gegenwart von UK 37,248 im PRP bei beiden Probanden über einer gewissen Schwellenkonzentration innerhalb von vier Minuten nicht auslösbar, wurde also vollkommen gehemmt, während sie unterhalb der Schwellenkonzentration unbeeinflusst blieb. Gegenüber dieser Alles-oder-nichts-Reaktion im PRP erfuhr die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im Vollblut eine dosisabhängige Hemmung, wobei sich die Ergebnisse für beide Probanden entsprachen. Trotzdem blieb der antiaggregatorische Effekt auch hier sowohl im PRP als auch im Vollblut deutlich hinter den stark inhibierenden Substanzen zurück.

Die gemessenen TxB_2 -Werte nach Kollagen-induzierter Aggregation liegen dabei im PRP und im Vollblut in einem gerade noch nachweisbaren Bereich und beweisen die fast vollkommene Unterdrückung der Thromboxanbildung durch UK 37,248. Dabei entspricht das Ausmaß der Aggregationshemmung allerdings nicht der sehr starken Senkung der TxA_2 - bzw. TxB_2 -Werte. Eine derartige Diskrepanz zwischen Verminderung der TxA_2 -Synthesekapazität und des Ausmaßes der Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation wird auch von anderen Untersuchern bestätigt (8,10,37,66,131).

Die Resultate der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation sowie die Diskrepanz zwischen Hemmung der Aggregation und Unterdrückung der TxA_2 -Synthese deuten damit darauf hin, daß die cyclischen Endoperoxide die Funktion des TxA_2 bei der Aggregation erfüllen können.

Die ADP-induzierte Aggregation wurde durch UK 37,248 nicht beeinträchtigt. Ein allenfalls geringer oder kein Effekt auf die ADP-induzierte Aggregation wird auch von anderen Untersuchern bestätigt (9,37,130). Auch hier wird die These unterstrichen, daß die cyclischen Endoperoxide und TxA_2 für die ADP-induzierte Aggregation keine große Bedeutung besitzen.

Die Ristocetin-induzierte Aggregation blieb durch UK 37,248 unbeeinflusst. Falls die Hypothese einer Bedeutung der cyclischen Endoperoxide bzw. von TxA_2 für die zweite Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation zutrifft, zeigt dieser Befund, daß auch die cyclischen Endoperoxide allein fähig sind, die Aggregation auszulösen.

Die leichte Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve deutet auf die Einwirkung proaggregatorischer Komponenten im Vollblut hin, zu denen z.B. ADP aus durch das Rühren in der Kuvette hämolysierten Erythrozyten oder PAF gehören konnten. Weiterhin sprechen die vorliegenden Resultate nicht dafür, daß im Fall einer Blockade der Thromboxansynthese der Entstehung von PGE_2 , PGD_2 oder PGI_2 , die in Leukozyten (108) oder Monozyten (40) ablaufen kann, in vitro eine entscheidende Bedeutung zukommt.

4.3.5. UK 38,485

4.3.5.1. Wirkungsweise von UK 38,485

UK 38,485, wie UK 37,248 ein Imidazolderivat, ist eine Prüfsubstanz, die bisher vor allem im Tierexperiment untersucht wurde. Es wirkt als Inhibitor der Thromboxansynthetase. Die Aktivität der Cyclooxygenase und der PGI_2 -Synthetase wird dabei nicht beeinflusst (6). Im übrigen gilt bezüglich der möglichen Konsequenzen einer Hemmung der Thromboxansynthetase das unter 4.3.4.1. für UK 37,248 gesagte.

4.3.5.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von UK 38,485: Einfluß und Folgerungen

Die Kollagen-induzierte Aggregation wurde im PRP und im Vollblut durch UK 38,485 dosisabhängig gehemmt. Dabei deutet

sich im Vollblut eine Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve gegenüber den Werten im PRP an. Da sich gerade in den hohen verwendeten Konzentrationen die Ergebnisse beider Probanden erheblich unterscheiden, ist eine Differenzierung der Wirkungsstärke zwischen UK 38,485 und UK 37,248 nicht möglich. Allerdings läßt sich feststellen, daß auch UK 38,485 nicht die Wirkungsstärke der stark inhibitorischen Substanzen wie z.B. Indomethacin erreicht.

Auch die Arachidonsäure-induzierte Aggregation wird durch UK 38,485 gehemmt. Dabei unterscheidet sich die Schwellenkonzentration für die Alles-oder-nichts-Reaktion nicht wesentlich von den anderen untersuchten Substanzen. Die inhibitorische Wirkung im Vollblut variiert in den höheren Konzentrationen ($3,7 \times 10^{-4}$ - $3,7 \times 10^{-5}$ M) zwischen den Probanden deutlich, so daß eine Wertung aufgrund der niedrigen Fallzahl unmöglich wird.

Die Analyse der TxA_2 -Synthesekapazität nach Kollagen-induzierter Aggregation ergibt Werte an der Untergrenze des meßbaren Bereichs, die im PRP wie im Vollblut zeigen, daß durch UK 38,485 die TxA_2 -Synthese fast völlig inhibiert wird. Daß dabei wieder eine Diskrepanz zwischen Hemmung der TxA_2 -Synthese und dem Ausmaß der Aggregation besteht, unterstreicht eine mögliche Rolle der cyclischen Endoperoxide. Die ADP-induzierte Aggregation wird durch UK 38,485 nicht beeinflusst, was abermals gegen eine größere Bedeutung von TxA_2 bei der ADP-induzierten Aggregation spricht. Die Unbeeinflussbarkeit der ADP-induzierten Aggregation durch Thromboxansynthetase-Inhibitoren, die zu einer extremen Suppression der TxA_2 -Bildung führen, steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, die eine weitgehende Unabhängigkeit der ADP-induzierten Aggregation von der TxA_2 -Produktion feststellten (125).

Die Ristocetin-induzierte Aggregation bleibt durch UK 38,485 im untersuchten Konzentrationsbereich unbeeinflusst. Die nach den Aggregationsreihen in Gegenwart von Indomethacin und Piroxicam aufgestellte Hypothese, daß die cyclischen Endo-

peroxide bzw. TxA_2 für die zweite Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation von Bedeutung sind, muß nach den Ergebnissen mit den Thromboxansynthetase-Inhibitoren dahingehend ergänzt werden, daß offenbar bei Blockade der TxA_2 -Bildung auch die cyclischen Endoperoxide allein die zweite Phase der Aggregation auslösen können.

Über die Einflüsse antiaggregatorischer Komponenten wie z.B. die PGI_2 -Produktion aus Leuko- oder Monozyten oder aggregationsfördernde Einflüsse wie ADP im Vollblut läßt sich wegen der geringen Unterschiede zum PRP aufgrund der Ergebnisse mit UK 38,485 keine Aussage treffen.

Im Hinblick auf eine eventuelle Fehleinschätzung der Wirkung der Thromboxansynthetase-Inhibitoren gelten die unter 4.3.4.2. getroffenen Feststellungen.

4.3.6. BM 13.177

4.3.6.1. Wirkungsweise von BM 13.177

In neuester Zeit wurden Anstrengungen unternommen, Einfluß auf die Thrombozytenmembran auszuüben und direkt auf den Rezeptor einzuwirken (31,58).

BM 13.177, auch eine noch nicht zugelassene Prüfsubstanz, die sich nach Tierexperimenten nun auch im klinischen Versuchsstadium befindet, hemmt selektiv die Thrombozytenaktivierung durch die cyclischen Endoperoxide und TxA_2 , wobei eine Blockade des gemeinsamen Rezeptors hervorgerufen und der sich selbst verstärkende Effekt der TxA_2 -Bildung unterbunden wird (96,110,111,133). Die genauen biochemischen Mechanismen sind dabei noch nicht geklärt.

Die Entstehung cyclischer Endoperoxide und von TxA_2 wird dabei durch BM 13.177 nicht gehemmt (111). Die Blutungszeit wird durch die Gabe von BM 13.177 in vivo verlängert (114).

4.3.6.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von BM 13.177: Einfluß und Folgerungen

BM 13.177 übte auf die Kollagen-induzierte Aggregation im PRP - vergleichbar mit Indomethacin - und im Vollblut - ähnlich wie Indomethacin und Piroxicam - eine stark inhibitorische Wirkung aus. Diese war für beide Probanden deutlich dosisabhängig und bezog sich sowohl auf das Ausmaß der Aggregation als auch auf die maximale Aggregationsgeschwindigkeit. Eindeutige Unterschiede zwischen den Ergebnissen im PRP und Vollblut waren dabei nicht vorhanden.

Diese Ergebnisse entsprechen denen von Untersuchungen in vivo, die eine Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation durch BM 13.177 ergaben (115).

Bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation übte BM 13.177 im PRP eine ähnliche Wirkung aus wie die meisten anderen Substanzen im Sinne einer Alles-oder-nichts-Reaktion. Im Vollblut zeigte sich eine stark dosisabhängige Hemmung.

Im Gegensatz dazu lagen die TxB_2 -Werte unter Zugabe von BM 13.177 sowohl im PRP als auch im Vollblut sehr hoch und teilweise erheblich über den Kontrollwerten. Eine Suppression der TxA_2 -Synthese durch BM 13.177 kann also durch diese Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Bei der Frage, womit die gegenüber den Kontrollwerten deutlich höheren TxB_2 -Werte in Gegenwart von BM 13.177 zu erklären sind, könnte eine gesteigerte TxA_2 -Synthese nicht blockierter Thrombozyten aufgrund einer fehlenden feedback-Hemmung durch die Rezeptorblockade im Rahmen eines Regelkreises diskutiert werden.

Die ADP-induzierte Aggregation blieb durch BM 13.177 unbeeinflusst, wobei nicht zwischen einer ersten und zweiten Phase der Aggregation unterschieden wurde (s. 4.2.2.2.).

Andere Arbeiten berichten von einer Hemmung der zweiten Phase der ADP-induzierten Aggregation (111,114), die auch nach oraler Applikation von BM 13.177 nachgewiesen wurde (115).

Bei der Ristocetin-induzierten Aggregation wurde durch BM 13.177 eine eindeutige dosisabhängige Hemmung der Aggregation hervorgerufen. Sie bezog sich wieder ausschließlich auf die zweite Phase der Aggregation. Dies verstärkt die Annahme, daß bei der zweiten Phase die cyclischen Endoperoxide und TxA_2 eine Rolle spielen.

Klare Unterschiede zwischen der Aggregationshemmung im PRP und Vollblut lassen sich in Gegenwart von BM 13.177 nicht zeigen.

4.3.7. Bezafibrat

4.3.7.1. Wirkungsweise von Bezafibrat

Bezafibrat ist ein Clofibrat-Analog und wie dieses eine Substanz mit lipidsenkender Wirkung. Für Clofibrat wurde z.T. von einer antiaggregatorischen Wirkung berichtet, wobei als Ursache eine Hemmung der Prostaglandinsynthese vermutet wurde (59).

Allerdings wurden auch aggregationsfordernde Effekte durch eine Senkung des cAMP-Spiegels gefunden (60).

Kenntnisse über den genauen Wirkungsmechanismus stehen dabei noch aus. Eine Verminderung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation ex vivo durch Bezafibrat wurde beschrieben (145).

4.3.7.2. Aggregationsreihen und TxB_2 -Spiegel in Gegenwart von Bezafibrat: Einfluß und Folgerungen

Bei der Kollagen-induzierten Aggregation zeigte Bezafibrat nur in den höchsten verwendeten Konzentrationen im PRP und bei einem Probanden im Vollblut einen erkennbaren inhibitorischen Effekt, während dieser bei dem zweiten Probanden im Vollblut völlig ausblieb. Dabei lag Bezafibrat in seiner antiaggregatorischen Wirksamkeit deutlich hinter allen anderen untersuchten Substanzen zurück.

Im PRP war bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation eine Hemmung im Sinn einer Alles-oder-nichts-Reaktion festzustellen, die aber erst in höchsten Konzentrationen ($3,7 \times 10^{-4}$ M bzw. $3,7 \times 10^{-5}$ M) und damit später als bei den anderen Substanzen auftrat. Im Vollblut läßt sich überhaupt keine Wirkung auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation erkennen.

Die TxB_2 -Werte lagen dabei alle -zumeist sehr ausgeprägt- über den Kontrollwerten ohne Inhibitorzugabe. Dies galt für beide Probanden sowohl im PRP als auch im Vollblut.

Die ADP-induzierte Aggregation blieb durch Bezafibrat unbeeinflußt und auch eine Wirkung auf die Ristocetin-induzierte Aggregation trat nicht auf.

Die Resultate demonstrieren, daß Bezafibrat nur bei der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation im PRP bzw. bei der Kollagen-induzierten Aggregation im Vollblut eine leichte Wirkung erkennen läßt. Diese beruht offenbar nicht auf einer Hemmung der Thromboxansynthetase oder der Cyclooxygenase.

Die sich aus der Thromboxanbestimmung ergebende Parallele zwischen Bezafibrat und BM 13.177 könnte ein Hinweis auf einen TxA_2 -Rezeptorantagonismus von Bezafibrat sein, der allerdings erheblich weniger wirksam ist oder sich erst in höheren Konzentrationen ausgeprägter manifestiert. Ein solcher Rezeptorantagonismus ist vor allem auch deshalb zu diskutieren, weil eine strukturelle Verwandtschaft zwischen Bezafibrat und BM 13.177 (s. Abb. 10 und 11) besteht.

4.3.8. Überblick über die Wirkungsweise der Inhibitoren und mögliche Konsequenzen unter physiologischen Bedingungen

Die Cyclooxygenase-Hemmer blockieren die Bildung von cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 im Thrombozyten und entfalten auf diesem Weg einen antiaggregatorischen Effekt. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase in Endothelzellen und Zellen des Blutes wird dort aber auch die PGI_2 -Synthetase gehemmt. Auch wenn die hier vorliegenden Resultate in Vollblut nicht für einen Einfluß der PGI_2 -Synthese durch Leuko- oder Monozyten auf die Thrombozytenaggregation ex vivo sprechen, kommt doch der PGI_2 -Bildung durch Endothelzellen als antiaggregatorischem Schutzmechanismus -zumindest lokal- eine erhebliche Bedeutung zu, so daß eine -wenn auch reversible- Hemmung der PGI_2 -Synthese durch Cyclooxygenase-Hemmer unerwünscht ist. Spekulativ läßt sich feststellen, daß Ergebnisse aus in vitro-Untersuchungen mit Cyclooxygenase-Hemmern gegenüber denen mit Thromboxansynthetase-Inhibitoren den natürlichen Verhältnissen eher entsprechen könnten, da der im Aggregometer unberücksichtigte Einfluß der endothelialen PGI_2 -Synthese durch die Cyclooxygenase-Inhibitoren auch in natura blockiert wird, aber bei Einsatz der Thromboxansynthetase-Inhibitoren durch Utilisierung angehäufter cyclischer Endoperoxide zusätzliche Bedeutung haben könnte.

Die durch Thromboxansynthetase-Inhibitoren hervorgerufene Minderung der TxA_2 -Synthesekapazität wird auch durch die hier dargestellten Ergebnisse eindeutig belegt. Allerdings kommt es zu einer Anhäufung der proaggregatorisch wirkenden cyclischen Endoperoxide. Die Resultate dieser Arbeit stützen die Hypothese, daß die cyclischen Endoperoxide -zumindest bei Blockade der TxA_2 -Synthese- aufgrund ihrer aggregatorischen Potenz auch allein fähig sind, die Aggregation auszulösen. Sofern sich in vivo Analoges ereignet, stellt dies die Effizienz reiner Thromboxansynthetase-Inhibitoren in Frage (58,131).

Der Aufbau der cyclischen Endoperoxide und die sich damit möglicherweise ergebende Utilisierung durch Endothelzellen könnte andererseits über gesteigerte PGI_2 -Synthese eine Potenzierung des gewünschten antiaggregatorischen Effekts mit sich bringen, so daß die antiaggregatorische Wirksamkeit von Thromboxansynthetase-Inhibitoren durch die Ergebnisse von in vitro-Untersuchungen auch unterschätzt werden könnte (113). Während nämlich bei dieser Versuchsanordnung die endotheliale PGI_2 -Synthese nicht erfaßt wird, geht der proaggregatorische Effekt der cyclischen Endoperoxide in die Ergebnisse der Aggregationsreihen ein. Die Befunde eines erhöhten PGI_2 -Spiegels bei Patienten mit genetisch bedingtem Thromboxansynthetase-Mangel (39) sprechen für die Utilisierung der cyclischen Endoperoxide durch Endothelzellen. Auch die bei diesen Patienten auftretende Verlängerung der Blutungszeit ist aufgrund der erhöhten PGI_2 -Synthese zu erwarten (135). Andererseits konnte nach in vivo-Gabe des Thromboxansynthetase-Hemmers UK 37,248 nur eine leichte Verlängerung der Blutungszeit festgestellt werden (134), was gegen eine vermehrte PGI_2 -Synthese aus cyclischen Endoperoxiden spricht.

Weiterhin legen neue Untersuchungen eine erhöhte PGD_2 -Synthese mit konsekutivem cAMP-Anstieg und Aggregationshemmung durch die Thromboxansynthetase-Inhibitoren nahe (12).

Somit ist eine Beurteilung der Wirkung der Thromboxansynthetase-Inhibitoren erst möglich, wenn die Rolle der cyclischen Endoperoxide in vivo sicher geklärt ist.

Die Thromboxanrezeptor-Antagonisten, die nicht die Bildung, aber die Wirkung der cyclischen Endoperoxide und von TxA_2 verhindern, vermeiden die Nebeneffekte der Unterbindung der PGI_2 -Synthese durch Cyclooxygenase-Hemmer und des Aufbaus der cyclischen Endoperoxide durch Thromboxansynthetase-Inhibitoren. Dies könnte je nach Bedeutung der cyclischen Endoperoxide ein erwünschter oder unerwünschter Effekt sein.

Unter Umständen könnte sich in vivo auch eine Kombination von Thromboxanrezeptor-Blockern, die auch die Rezeptoren der cyclischen Endoperoxide blockieren, mit Thromboxansynthetase-Inhibitoren als sinnvoll erweisen, da damit die Wirkung von TxA_2 bzw. der cyclischen Endoperoxide aufgehoben würde, aber eine Umwandlung der Endoperoxide in PGI_2 und PGD_2 möglich wäre.

Bei allen bisherigen Betrachtungen hinsichtlich der Beeinflussung des Arachidonsäure-Metabolismus wurde ausschließlich der Cyclooxygenase-Stoffwechselweg betrachtet. Trotzdem sollte nicht unbeachtet bleiben, daß auch eine Verstoffwechselung der Arachidonsäure über den Lipxygenase-Stoffwechselweg möglich ist (s. Abb. 2), der vor allem bei Blockierung der Cyclooxygenase von Bedeutung sein könnte. Die dabei entstehenden Leukotriene (80), von denen z.B. chemotaktische Wirkung ausgeht, könnten entscheidend in Hämostasevorgänge eingreifen.

Dies muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

In der Arbeit wurde versucht, durch Eingriffe in den Stoffwechsel und die Interaktion der Prostaglandine und die daraus resultierende Modulation der Aggregation Aufschlüsse über die Rolle verschiedener Arachidonsäure-Metaboliten, vor allem der cyclischen Endoperoxide und des TxA_2 zu gewinnen.

Ferner wurde zwischen der Aggregation im PRP und Vollblut verglichen, um zusätzliche Einflußfaktoren im natürlicheren Milieu Vollblut auf die Aggregation zu erkennen.

Dazu wurde die Aggregation im PRP photometrisch und im Vollblut mit der Impedanzmethode gemessen. Als wesentlicher Vorteil der neuen Methode der Vollblutaggregometrie zeigte sich dabei, daß eine zeitintensive Probenaufbereitung wie bei der photometrischen Methode entfällt und artefizielle Einflüsse durch die Zentrifugierung vermieden werden können.

Die Aggregation wurde durch Kollagen, Arachidonsäure, ADP und Ristocetin ausgelöst.

Die Modulation der Aggregation erfolgte durch Inhibitoren der Cyclooxygenase, der Thromboxansynthetase und durch Rezeptorantagonisten.

Weiterhin wurde die Thromboxansynthese im zeitlichen Verlauf nach Kollagen-induzierter Aggregation gemessen.

Durch alle Inhibitoren zeigten sich Einflüsse auf die Aggregation im PRP und Vollblut. Bei der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation, in deren Ablauf den cyclischen Endoperoxiden und TxA_2 eine entscheidende Rolle zugewiesen wird, war beständig eine Thrombozytenfunktionshemmung in unterschiedlichem Ausmaß konzentrationsabhängig nachweisbar.

Für die Kollagen- und Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart der Cyclooxygenase-Inhibitoren läßt sich feststellen, daß durch Indomethacin eine sehr starke Hemmung der Aggregation zu erzielen war, die mit einer deutlichen Reduzierung der TxA_2 -Syntheserate verbunden war.

Die anderen Cyclooxygenasehemmer Piroxicam und Acetylsalicylsäure waren schwächer wirksam und bewirkten eine geringere Hemmung der Aggregation und TxA_2 -Produktion. Dabei war Piroxicam noch stark antiaggregatorisch wirksam, bei Acetylsalicylsäure war nur im oberen Konzentrationsbereich ein Effekt nachweisbar.

Die Thromboxansynthetase-Inhibitoren UK 37,248 und UK 38,485 bewirkten ebenfalls eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Aggregation, die aber nicht so stark wie die durch Indomethacin erreichte war. Der im Vergleich mit den anderen Inhibitoren mittelgradig stark ausgeprägten Hemmung der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation stand eine fast vollkommene Hemmung der TxA_2 -Synthesekapazität durch die Thromboxansynthetase-Inhibitoren gegenüber.

Der Rezeptorantagonist BM 13.177 entfaltete eine sehr starke, mit Indomethacin vergleichbare inhibitorische Wirkung. Die TxA_2 -Syntheserate wurde dabei nicht supprimiert, womit unterstrichen wird, daß durch BM 13.177 die TxA_2 -Synthese nicht vermindert wird. Vielmehr lagen die Werte der TxB_2 -Bestimmung erheblich über den Kontrollwerten, wobei eine fehlende feedback-Hemmung der Thromboxansynthese durch Rezeptorantagonisten im Rahmen eines Regelkreises diskutiert werden kann. In Gegenwart von Bezafibrat, das nur eine geringe Aggregationshemmung zur Folge hatte und dessen Wirkmechanismus noch nicht genau geklärt ist, ergab sich ebenfalls eine erhöhte TxA_2 -Synthesekapazität. Dies könnte für einen Rezeptorantagonismus sprechen, zumal eine strukturelle Verwandtschaft zu BM 13.177 besteht.

Beim Vergleich der Aggregation in PRP und Vollblut läßt sich aufgrund der Ergebnisse keine klare Aussage über eventuell vorliegende proaggregatorische Komponenten im Vollblut treffen. Allerdings deuten die Resultate nicht darauf hin, daß einer antiaggregatorischen PGI_2 -Bildung durch Leuko- oder Monozyten (40,108) große Bedeutung zukommt.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine Bedeutung von TxA_2 bei der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregation. Ferner ist festzustellen, daß die cyclischen Endoperoxide bei Blockade der TxA_2 -Synthese - zumindest in vitro - die Aggregation auslösen können.

Die ADP-induzierte Aggregation wurde durch die Inhibitoren nicht beeinflusst. Daher ist eine entscheidende Bedeutung der cyclischen Endoperoxide bzw. von TxA_2 bei der durch ADP ausgelösten Aggregation unwahrscheinlich.

Die Ristocetin-induzierte Aggregation, die nur im PRP durchgeführt wurde, wurde in der zweiten Phase durch Indomethacin, Piroxicam und BM 13.177 konzentrationsabhängig gehemmt. Diesen Substanzen ist gemeinsam, daß sie die Synthese bzw. den Einfluß sowohl der cyclischen Endoperoxide als auch von TxA_2 stark unterbinden. Daher muß eine Bedeutung dieser Prostaglandin-Metaboliten für die zweite Phase der Ristocetin-induzierten Aggregation angenommen werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 AMEZCUA, J. L., J. O GRADY, J. A. SALMON, S. MONCADA:
Prolonged paradoxical effect of aspirin on platelet
behaviour and bleeding time in man
Thrombos. Res. 16: 69 - 79 (1979)
- 2 BAUMGARTNER, H. R.:
Effects of acetylsalicylic acid, sulfinpyrazone and
dipyridamole on platelet adhesion and aggregation in
flowing native and anticoagulated blood
Haemostasis 8: 340 - 352 (1979)
- 3 BENNETT, J. S., G. VILAIRE:
Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and
epinephrine
J. Clin. Invest. 64: 1393 - 1401 (1979)
- 4 BENSUSAN, J. S., T. L. KOH, K. G. HENRY, B. A. MURRAY,
L. A. CULP:
Evidence that fibronectin is the collagen receptor on
platelet membranes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5864 - 5868 (1978)
- 5 BENVENISTE, J., P. M. HENDERSON, C.G. COCHRANE:
Leukocyte-dependent histamine release from rabbit
platelets
J. Exp. Med. 136: 1356 - 1375 (1972)
- 6 BERESFORD, A. P.:
Investigators' reference manual UK 38,485 (nicht
veröffentlichtes Manuskript der Pfizer Ltd., keine
Jahresangabe)

- 7 BERGMANN, G., L. ATKINSON, P. J. RICHARDSON, K. DALY, M. ROTHMANN, G. JACKSON, D. M. JEWITT:
Prostacyclin: Haemodynamic and metabolic effects in patients with coronary artery disease
Lancet: 569 - 572 (1981)
- 8 BERTELE, V., C. CERLETTI, A. SCHIEPPATI, G. DI MINNO, G. DE GAETANO:
Inhibition of thromboxane synthetase does not necessarily prevent platelet aggregation
Lancet 1: 1057 - 1058 (1981)
- 9 BERTELE, V., M. TOMASIAK, A. FALANGA, C. CERLETTI, G. DE GAETANO:
Aspirin inhibits platelet aggregation but not because it prevents thromboxane synthesis
Lancet 1: 775 (1982)
- 10 BERTELE, V., A. FALANGA, M. C. RONCAGLIONI, C. CERLETTI, G. DE GAETANO:
Thromboxane synthesis inhibition results in increased platelet sensitivity to prostacyclin
Thrombos. Haemostas. 47: 294 (1982)
- 11 BERTELE, V., A. FALANGA, M. TOMASIAK, E. DEJANA, C. CERLETTI, G. DE GAETANO:
Platelet thromboxane synthetase inhibitors with low dosis of aspirin: Possible resolution of the "aspirin dilemma"
Science 220: 517 - 519 (1983)

- 12 BERTELE, V., A. FALANGA, M. TOMASIAK, C. CERLETTI, G. DE GAETANO:
SQ 22536, an adenylat-cyclase inhibitor, prevents the antiplatelet effect of dazoxiben, a thromboxane-synthetase inhibitor
Thrombos. Haemostas. 51 (1): 125 -128 (1984)
- 13 BLACKWELL, G. J., R. J. FLOWER, N. RUSSELL-SMITH, J. A. SALMON, P. B. THOROGOOD, J. R. VANE:
Prostacyclin is produced in whole blood
Brit. J. Pharmacol. 64: 436 (1978)
- 14 BORN, G. V. R.:
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal
Nature 194: 927 - 929 (1962)
- 15 BORN, G. V. R., M. J. CROSS:
The aggregation of blood platelets
J. Physiol. 168: 178 - 195 (1963)
- 16 BORN, G. V. R.:
Uptake of adenosine and of adenosine diphosphate by human platelets
Nature 206: 1121 - 1122 (1965)
- 17 BOURGAIN, R. H., R. ANDRIES, F. SIX:
Role of prostaglandin biochemical pathway in platelet - vessel wall interaction and local thrombosis
Haemostasis 11: 133 - 138 (1982)
- 18 BREDDIN, K.:
Pro - Kontra: Antikoagulantien oder Thrombozyten-funktionshemmer in der Prophylaxe des Herzinfarktes?
Der Internist 21: 394 - 396 (1980)

- 19 BREDDIN, K., M. ZIEMEN, O. BAUER, W. HERMANN, L. SCHAUDINN, U. SCHLOSSER, A. WINTERHAGEN, H. J. KRZYWANIEK:
Time and temperature dependent changes of ADP- and collagen-induced and "spontaneous" aggregation
Thromb. Res. 19: 621 - 638 (1980)
- 20 BUCHANAN, M. R., J. A. RISCHKE, J. HIRSH:
Aspirin inhibits platelet function independent of acetylation of cyclooxygenase
Thromb. Res. 25: 363 - 373 (1982)
- 21 BUCHANAN, M. R., J. A. RISCHKE, R. BUTT, A. G. G. TURPIE, J. HIRSH, J. ROSENFELD:
The sex-related differences in aspirin pharmacokinetics in rabbit and man and its relationship to antiplatelet effects
Thromb. Res. 29: 125 - 139 (1983)
- 22 BURCH, J. W., R. J. LAMB:
Sodium arachidonate induced platelet aggregation is independent of secreted adenosine diphosphate
Thromb. Res. 31: 747 - 758 (1983)
- 23 BUTKUS, A., V. SKRINSKA, P. SCHUHMACHER:
Thromboxane production and platelet aggregation in diabetic subjects with clinical complications
Thromb. Res. 19: 211 - 223 (1980)
- 24 BUTLER, R. R., W. C. WISE, P. V. HALUSHKA, J. A. COOK:
Gentamycin and indomethacin in the treatment of septic shock: Effects on prostacyclin and thromboxane A_2 production
J. Pharmacol. Exper. Ther. 225: 94 - 101 (1983)

- 25 CAREY, F., S. MENASHI, N. CRAWFORD:
Localisation of cyclooxygenase and thromboxane
synthetase in human platelet intracellular membranes
Biochem. J. 204: 847 - 851 (1982)
- 26 CARDINAL, D. C., R. J. FLOWER:
The electronic aggregometer: A novel device for
assessing platelet behaviour in blood
J. Pharmacol. Methods 3: 135 - 158 (1980)
- 27 CARTY, T. J., J. D. ESKRA, J. G. LOMBARDINO, W. W.
HOFFMANN:
Piroxicam, a potent inhibitor of prostaglandin
production in cell culture. Structure-activity study.
Prostaglandins 19: 51 - 59 (1980)
- 28 CELLA, G., A. SCHIVAZAPPA, L. G. CASONATO, A. MOLARO, J.
GIROLAMI, D. A. WESTWICK, LANE, V. V. KAKKAR:
In vivo platelet release reaction in patients with heart
valve prosthesis
Haemostasis 9: 263 - 275 (1980)
- 29 CHIANG, T. M., E. H. BEACHEY, A. H. KANG:
Binding of collagen α_1 chains to human platelets
J. Clin. Invest. 59: 405 - 411 (1977)
- 30 COCKBILL, S.R., S. HEPTINSTALL, P. M. TAYLOR:
A comparison of the abilities of acetylsalicylic acid,
flurbiprofen and indomethacin to inhibit the release
reaction and prostaglandin synthesis in human blood
platelets
Brit. J. Pharmacol. 67: 73 - 78 (1979)

- 31 COLEMAN, R. A., E. W. COLLINGTON, H. P. GEISOW, E. J. HORNBY, P. P. A. HUMPHREY, J. KENNEDY, G. P. LEVY, P. LUMLEY, P. J. MC GABE, C. J. WALLIS:
AH 19437, a specific thromboxane receptor blocking drug
Brit. J. Pharmacol. 72: 523 (1981)
- 32 COLLER, B. S., H. R. GRALNICK:
Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet
agglutination
J. Clin. Invest. 60: 302 - 312 (1977)
- 33 COPPE, D., S. J. WESSINGER, B. J. RANSIL, W. HARRIS, E. SALZMANN:
Sex differences in the platelet response to aspirin
Thromb. Res. 23: 1 - 21 (1981)
- 34 COUCH, J., R. HASSANEIN:
Platelet aggregation, stroke and transient ischemic
attack in middle-aged and elderly patients
Neurology 26: 888 - 894 (1976)
- 35 COWAN, D. H.:
Platelet adherence to collagen: Role of prostaglandin-
thromboxane synthesis
Brit. J. Haematol. 49: 425 - 434 (1981)
- 36 CRONBERG, S., E. WALLMARK, I. SÖDERBERG:
Effect on platelet aggregation of oral administration of
10 non-steroidal analgesics to humans
Scand. J. Haematol. 33: 155 - 159 (1984)
- 37 DALE, J., E. THAULOW, E. MYHRE, J. PARRY:
The effect of a thromboxane synthetase inhibitor,
dazoxiben, and acetylsalicylic acid on platelet function
and prostaglandin metabolism
Thromos. Haemostas. 50: 703 - 706 (1983)

- 38 DAVI, G., G. B. RINI, M. AVERNA, S. NOVO, G. DI FEDE, A. PINTO, A. NOTABAROLO, A. STRANO,:
Thromboxane B_2 formation and platelet sensitivity to prostacyclin in insulin-dependent and insulin-independent diabetics
Thromb. Res. 26: 359 - 370 (1982)
- 39 DEFREYN, G., S. J. MACHIN, L. O. CARRERAS, M. VERGARA DAUDEN, D. A. F. CHAMONE, J. VERMYLEN:
Familial bleeding tendency with partial platelet thromboxane synthetase deficiency: Reorientation of cyclic endoperoxide metabolism
Brit. J. Haematol. 49: 29 - 41 (1981)
- 40 DEFREYN, G., H. DECKMYN, J. VERMYLEN:
A thromboxane synthetase inhibitor reorients endoperoxide metabolism in whole blood towards prostacyclin and prostaglandin E_2
Thromb. Res. 26: 389 - 400 (1982)
- 41 DOMSCHKE, S., W. DOMSCKE:
Fortschritte in der Prostaglandinforschung
Med. Mo. Pharm. 1: 6 - 13
- 42 FEINBERG, G., W. C. SANDLER, M. SCORER, G. C. LE BRETON, B. GROSSMAN, G. V. R. BORN:
Movement of sodium into human platelets by ADP
Biochim. Biophys. Acta 470: 317 - 324 (1977)
- 43 FITZGERALD, G. A., J. A. OATES, J. HAWINGER, R. L. MAAS, L. J. ROBERTS, J. A. LAWSON, A. R. BRASH:
Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man
J. Clin. Invest. 71: 676 -688 (1983)

- 44 FLOWER, R. J., D. C. CARDINAL:
Use of a novel platelet aggregometer to study the generation by, and actions of, prostacyclin in whole blood
in: Prostacyclin, Hrsg.: J.R. Vane, S. Bergström, Raven Press, New York (1979)
- 45 GAARDER, A., J. JONSEN, S. LALAND, A. HELLEM, P. A. OWREN:
Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets
Nature 192: 531 - 532 (1961)
- 46 GAYNOR, B. J., J. W. CONSTANTINE:
The effect of piroxicam on platelet aggregation
Experientia 35: 797 - 798 (1979)
- 47 GERRARD, J. M., J. G. WHITE:
Prostaglandins and thromboxanes: "Middlemen" modulating platelet function in hemostasis and thrombosis
in: Progress in hemostasis and thrombosis Vol. 4, Hrsg.: T. H. Spaeth, Grune and Stratton, New York (1980)
- 48 GORMAN, R. R., S. BUNTING, O. V. MILLER:
Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX)
Prostaglandins 13: 377 - 388 (1977)
- 49 GRESELE, P., E. VAN HOUTTE, J. ARNOUT, H. DECKMYN, J. VERMYLEN:
Thromboxane synthase inhibition combined with thromboxane receptor blockade: A step forward in antithrombotic strategy?
Thrombos. Haemostas. 52: 364 (1984)

- 50 HAMBERG, M., B. SAMUELSSON:
Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of
arachidonic acid in human platelets
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3400 -3404 (1974)
- 51 HAMBERG, M., J. SVENSSON, T. WAKABAYASHI, B. SAMUELSSON:
Isolation and structure of two prostaglandin
endoperoxides that cause platelet aggregation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 345 - 349 (1974)
- 52 HAMBERG, M., J. SVENSSON, B. SAMUELSSON:
Thromboxanes: A new group of biologically active
compounds derived from prostaglandin endoperoxides
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2994 - 2998 (1975)
- 53 HASLAM, R. J., J. A. LYNHAM:
Relationship between phosphorylation of blood platelets
and secretion of platelet granule constituents. Effects
of different inhibitors.
Thromb. Res. 12: 619 - 628 (1978)
- 54 HIRSH, P. D., L. D. HILLIS, W. B. CAMPBELL, B. G.
FIRTH, J. T. WILLERSON:
Release of prostaglandins and thromboxane into the
coronary circulation in patients with ischemic heart
disease
New Engl. J. Med. 304: 685 - 691 (1981)
- 55 HOLMSEN, H.:
Prostaglandin endoperoxide - thromboxane synthesis and
dense granule secretion as positive feedback loops in
the propagation of platelet responses during "the basic
platelet reaction"
Thrombos. Haemostas. 38: 1030 -1041 (1977)

- 56 HORNSTRA, G., E. HADDEMAN, J. A. DON:
Blood platelets do not provide endoperoxides for
vascular prostacyclin production
Nature 279: 66 -68 (1979)
- 57 HORNYCH, A., M. SAFAR, J. BARIETY, A. SIMON, G. LONDON,
J. LEVENSON:
Thromboxane B₂ in borderline and essential hypertensive
patients
Prostaglandins, Leukotriens and Medicine 10: 145 - 155
(1983)
- 58 HUNG, S. C., N. J. GUALI, D. L. VENTON, G. C. LE
BRETON:
Specific binding of the thromboxane A₂ antagonist 13-
azaprostanoic acid to human platelet membranes
Biochim. Biophys.Acta 728: 171 - 178 (1983)
- 59 HUZoor-AKBAR, S. PATEL, S. S. KONRADY, D. T. WITIAK, H.
A. I. NEWMAN, D. R. FELLER:
Effects of clofibrate and 6-substituted chromam
analogues on human platelet function: Mechanism of
inhibitory action
Biochem. Pharm. 30: 2013 - 2020 (1981)
- 60 HUZoor-AKBAR, D. T. WITIAK, H. A. I. NEWMAN, R. H.
FERTEL, D. R. FELLER:
Potentiating effects of clofibrate on prostaglandin-
dependent and -independent pathways of human platelet
activation: Evidence for involvement of cyclic AMP.
Biochem. Pharm. 31: 2125 - 2127 (1982)
- 61 INGERMAN-WOJENSKI, C. M., J. B. SMITH, M. J. SILVER:
Difficulty in detecting inhibition of platelet
aggregation by the impedance method
Thromb. Res. 28: 427 - 432 (1982)

- 62 INGERMAN-WOJENSKI, C. M., J. B. SMITH, M. J. SILVER:
Evaluation of electrical aggregometry: Comparison with
optical aggregometry, secretion of ADP and
accumulation of radiolabeled platelets
J. Lab. Clin. Med. 101: 44 - 52 (1983)
- 63 JAFFE, E. A., B. B. WEKSLER:
Recovery of endothelial cell prostacyclin production
after inhibition by low doses of aspirin
J. Clin. Invest. 63: 532 - 535 (1979)
- 64 JENKINS, C. S. P., D. MEYER, M. D. DREYFUS, M. J.
LARRIEU:
Willebrand factor and ristocetin
Brit. J. Haematol. 28: 561 - 578 (1974)
- 65 JENKINS, C. S. P., K. J. CLEMETSON, E. F. LUSCHER:
Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet
agglutination: Binding of ristocetin to platelets
J. Lab. Clin. Med. 93: 220 -231 (1979)
- 66 KAKKAR, V. V., J. WESTWICK, J. ZAHAVI, H. TYLER:
Single oral dose administration of a specific
thromboxane synthetase inhibitor to normal volunteers
Thrombos. Haemostas. 46: 26 (1981)
- 67 KAO, K.-J., S. V. PIZZO, P. A. MC KEE:
Demonstration and characterization of specific binding
sites for factor VIII/ von Willebrand factor on human
platelets
J. Clin. Invest. 63: 656 - 664 (1979)

- 68 KAO, K.-J., B. TSAI, P. A. MC KEE, R. J. LEFKOWITZ, S. V. PIZZO:
Inhibiting effect of ristocetin and factor VIII/von Willebrand factor protein on human platelet adenylyate cyclase activity
Thromb. Res. 30: 301 - 308 (1983)
- 69 KARPATKIN, S., E. PEARLSTEIN:
Role of platelets in tumor cell metastases
Ann. Int. Med. 95: 636 - 641 (1981)
- 70 KATTLOVE, H. E., M. H. GANEZ:
Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation
Blood 45: 91 - 96 (1975)
- 71 KELTON, J. G., J. HIRSH, C. G. CARTER, M. R. BUCHANAN:
Sex differences in the antithrombotic effects of aspirin
Blood 52: 1073 - 1076 (1978)
- 72 KELTON, J. G., C. J. CARTER, J. ROSENFELD, M. P. MASICOLLE-NOLAN, J. HIRSH:
Sex related differences in the efficacy of acetylsalicylic acid (ASA): The absorption of ASA and its effect on collagen-induced thromboxane B₂ generation
Thromb. Res. 24: 163 - 168 (1981)
- 73 KELTON, J. G., C. J. CARTER, A. SANTOS, J. HIRSH:
Sex related differences in platelet function: The effect of aspirin
Blood 59: 625 - 627 (1982)

- 74 KINLOUGH-RATHBONE, R. L., H. J. REIMERS, J. F. MUSTARD:
Sodium arachidonate can induce platelet shape change
and aggregation which are independent of the release
reaction
Science 192: 1011 - 1012 (1976)
- 75 KINLOUGH-RATHBONE, R. L., M. A. PACKHAM, H. J. REIMERS,
J. P. CAZENAVE, J. F. MUSTARD:
Mechanisms of platelet shape change, aggregation, and
release induced by collagen, thrombin, or A 23,187
J. Lab. Clin. Med. 90: 707 - 719
- 76 KNUDSEN, J. B., A. JUHL, J. GARMSSEN:
Thromboxane synthetase inhibition in patients with
atherosclerotic heart disease
Lancet 1: 198 (1981)
- 77 LAGARDE, M., O. FELISI, D. BOUKHACHE, B. SICARD, M.
DECHAVANNE:
Relationship between cyclic AMP and thromboxane
formation in platelet-endothelial cell interactions
Thromb. Res. 35: 141 - 147 (1984)
- 78 LANDBECK, G.:
Störungen der Hämostase. In: Harnack, G.A. v.,
Kinderheilkunde, 5. Auflage, Springer, Berlin (1980)
- 79 LEITHNER, C., H. SINZINGER, K. SILBERBAUER:
Prostazyklin ein Schutzfaktor für Gefäße
Fortschritte der Medizin 47: 1845 -1849 (1980)
- 80 LEWIS, G. P.:
Neue Erkenntnisse über Arachidonsäuremetaboliten
Med. Welt 32: 920 - 921 (1980)

- 81 LEWY, R. I., L. WIENER, P. WALINSKY, A. M. LEFER, M. J. SILVER, J. B. SMITH:
Thromboxane release during pacing-induced angina pectoris: Possible vasoconstrictor influence on the coronary vasculature
Circulation 61: 1165 - 1171 (1980)
- 82 LIVIO, M., A. DEL MASCHIO, C. CERLETTI, G. DE GAETANO:
Indomethacin prevents the long lasting effect of aspirin on human platelet cyclooxygenase activity
Prostaglandins 23: 787 - 796 (1982)
- 83 MAGUIRE, E. D., R. B. WALLIS:
In vivo redirection of prostaglandin endoperoxides into 6-keto-PGF₁ formation by thromboxane synthetase inhibitors in the rat
Thromb. Res. 32: 15 - 27 (1983)
- 84 MARCUS, A. J.:
Platelet function
New Engl. J. Med. 280: 1213 - 1219 (1969)
- 85 MARCUS, A. J., B. B. WEKSLER, E. A. JAFFE, M. J. BROEKMAN:
Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells
J. Clin. Invest. 66: 979 - 986 (1980)
- 86 MASOTTI, G., L. POGGESI, G. GALANTI, R. ABBATE, G. G. NERI-SERNERI:
Differential inhibition of prostacyclin production and platelet aggregation by aspirin
Lancet 2: 1213 - 1216 (1979)

- 87 MC INTYRE, B., R. B. PHILP:
Effect of three nonsteroidal anti-inflammatory agents
on platelet function and prostaglandin synthesis in
vitro
Thromb. Res. 12: 67 - 77 (1977)
- 88 MEHTA, P., J. MEHTA:
Platelet function studies in coronary heart disease:
VIII. Decreased platelet sensitivity to prostacyclin in
patients with myocardial ischemia
Thromb. Res. 18: 273 -277 (1980)
- 89 MEHTA, J., P. MEHTA, D. HAY:
Effect of dipyridamole on prostaglandin generation by
human platelets and vessel walls
Prostaglandins 24: 751 - 761 (1982)
- 90 MILLER, O. V., R. A. JOHNSON, R. R. GORMAN:
Inhibition of PGE_1 -stimulated cAMP accumulation in
human platelets by thromboxane A_2
Prostaglandins 13: 599 - 609 (1977)
- 91 MONCADA, S., P. NEEDLEMAN, S. BUNTING, J. R. VANE:
Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating
systems and their selective inhibition
Prostaglandins 12: 323 - 327 (1976)
- 92 MONCADA, S., S. BUNTING, K. MULLANE, P. THOROGOOD, J.
R. VANE:
Imidazole: A selective inhibitor of thromboxane
synthetase
Prostaglandins 13: 611 - 618 (1977)
- 93 MONCADA, S., J. R. VANE:
Arachidonic acid metabolites and the interactions
between platelets and blood-vessel walls
New Engl. J. Med. 300: 1142 - 1147 (1979)

- 94 MONCADA, S., J. R. VANE:
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin
endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacyclin
Pharmacol. Reviews 30: 293 - 331 (1979)
- 95 MORAWITZ, P.:
Die Chemie der Blutgerinnung
Ergebnisse Physiologie 4: 307 (1905)
- 96 MÜLLER-BECKMANN, B., K. STEGMAIER, W. SCHMITT, H.
PATSCHEKE:
Evidence for competitive antagonism of BM 13.177 to U
46619 (thromboxane mimetic) induced constriction of
rabbit aorta
IRCS Medical Sciences 11: 1100 - 1101 (1983)
- 97 MUSTARD, J. F., M. A. PACKHAM:
Platelets and diabetes mellitus
New Engl. J. Med. 311: 665 - 667 (1984)
- 98 NEEDLEMAN, P., S. MONCADA, S. BUNTING, J. R. VANE:
Identification of an enzyme in platelet microsomes
which generates thromboxane A_2 from prostaglandin
endoperoxides
Nature 261: 558 - 560 (1976)
- 99 NEEDLEMAN, P., A. RAZ, J. A. FERRENDELLI, M. MINKES:
Application of imidazole as a selective inhibitor of
thromboxane synthetase in human platelets
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1716 - 1720 (1977)
- 100 NEEDLEMAN, P., A. WYCHE, A. RAZ:
Platelet and blood vessel arachidonate metabolism and
interactions
J. Clin. Invest. 63: 345 - 349 (1979)

- 101 O'BRIEN, J. R.:
Effects of salicylates on human platelets
Lancet 1: 779 - 783 (1968)
- 102 O'BRIEN, J. R.:
Platelet and vessel wall: How much aspirin?
Lancet 1 : 371 - 373 (1980)
- 103 OELZ, O.:
Das Prostaglandin-Thromboxan-System
Schweizerische Medizinische Wochenschrift 107: 753 -756
(1977)
- 104 OETTINGER, W., J. SEIFERT:
Pathophysiologische Bedeutung der Prostanoiden im
septischen Schock
Fortschr. Med. 100: 2169 - 2174 (1982)
- 105 OSTENDORF, P.:
Therapie mit Antikoagulantien und Thrombozytenaggrega-
tionshemmern bei extrakraniellen Gefäßstenosen und Ge-
fäßverschlüssen
Der Internist 20: 539 - 546 (1979)
- 106 PACKHAM, M. A., M. FRASER:
Clinical pharmacology of platelets
Blood 50: 555 - 573 (1977)
- 107 PACKHAM, M. A., J. F. MUSTARD:
Pharmacology of platelet-affecting drugs
Circulation 62 (suppl. V): V 26 - V 41 (1980)

- 108 PARRY, M. J., M. J. RANDALL, H. M. TYLER, E. MYHRE, J. DALE, E. THAULOW:
Selective inhibition of thromboxane synthetase by dazoxiben increases prostacyclin production by leucocytes in angina patients and healthy volunteers
Lancet 1: 164 (1982)
- 109 PATSCHEKE, H.:
Correlation of activation and aggregation of platelets
Haemostasis 8: 65 - 81 (1979)
- 110 PATSCHEKE, H., K. STEGMEIER:
BM 13.177 is a selective antagonist of prostaglandin H_2 and thromboxane A_2 in human platelets
IRCS Medical Science 12: 9 - 10 (1983)
- 111 PATSCHEKE, H., K. STEGMAIER:
Investigations on a new non-prostanoid thromboxane antagonist, BM 13.177, in human platelets
Thromb. Res. 33: 277 - 288 (1984)
- 112 PRESTON, F. E., S. WHIPPS, C. A. JACKSON, A. J. FRENCH, P. J. WYLD, C. J. STODDARD:
Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A_2 after low-dose aspirin
New Engl. J. Med. 304: 76 - 79 (1981)
- 113 RANDALL, M. J., M. J. PARRY, E. HAWKESWOOD, P. E. CROSS, R. P. DICKINSON:
UK 37,248, a novel selective thromboxane synthetase inhibitor with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity
Thromb. Res. 23: 145 - 162 (1981)

- 114 RIESS, H., G. BRAUN, G. BREHM, E. HILLER:
Critical evaluation of platelet aggregation in
whole human blood
Am. J. Clin. Path.: in Druck
- 115 RIESS, H., E. HILLER, B. REINHARD, C. BRÄUNING:
Effects of BM 13.177, a new antiplatelet drug in
patients with atherosclerotic disease
Thromb. Res. 35: 371 - 378 (1984)
- 116 ROPER, P., B. DREWINKO, D. HASLER, D. JOHNSTON, J.
HESLER, E. J. FREIREICH:
Effects of time, platelet concentration, and sex on
human platelet aggregation response
Amer. J. Clin. Path. 71: 263 -268 (1979)
- 117 ROSS, R., L. HARKER:
Hyperlipidemia and atherosclerosis
Science 193: 1094 - 1099 (1976)
- 118 ROTH, G. J., N. STANFORD, P. W. MAJERUS:
Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3073 - 3076 (1975)
- 119 ROTH, G. J., C. J. SIOK:
Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin
synthetase by aspirin
J. Biol. Chem. 253: 3782 - 3784 (1978)
- 120 RYBICKI, J. P., D. L. VENTON, G.C. LE BRETON:
The thromboxane antagonist, 13-azaprostanoic acid,
inhibits arachidonic acid-induced Ca²⁺ release from
isolated platelet membrane vesicles
Biochim. Biophys. Acta 751: 66 - 73 (1983)

- 121 SCHAFFER, A. I., R. I. HANDIN:
The role of platelets in thrombotic and vascular disease
Progress in cardiovascular diseases 22: 31 - 50 (1979)
- 122 SCHMIDT, B., I. ADLER, H. NIEDERHOFF, W. KÜNZER:
Vergleich einer Makro- und Mikromethode zur Messung der induzierten Thrombozytenaggregation mit Kollagen und Ristocetin
in: Praktische Anwendung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Hrsg.: Voss, H. v., Göbel, U., Stuttgart, Thieme (1980)
- 123 SHAIK, B.S., S. J. BOTT, L. DEMERS:
The differential inhibition of prostaglandin synthesis in platelets and vascular tissue in response to aspirin
Prostaglandins and medicine 4: 439 - 447 (1980)
- 124 SHATTIL, S., J. S. BENNETT:
Platelets and their membranes in hemostasis: Physiology and pathophysiology
Ann. Int. Med. 94: 108 - 118 (1980)
- 125 SIESS, W., P. ROTH, P. C. WEBER:
Stimulated platelet aggregation, thromboxane B_2 formation and platelet sensitivity to prostacyclin. A critical evaluation
Thrombos. Haemostas. 45: 204 - 207 (1981)
- 126 SILBERBAUER, K., G. SCHERNTHAUER, H. SINZINGER, H. PIZA-KATZER, M. WINTER:
Decreased vascular prostacyclin in juvenile-onset diabetes
New. Engl. J. Med. 300: 366 - (1979)

- 127 SILVERTSEN, U.:
The influence of storage on ADP-induced platelet aggregation
Scand. J. Haematol. 9: 215 - 221 (1972)
- 128 SMITH, J. B., A. L. WILLIS:
Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets
Nature New Biology 231: 235 - 237 (1971)
- 129 SMITH, J. B.:
Prostaglandins and platelet aggregation
Acta Med. Scand. Suppl. 651: 91 - 98 (1981)
- 130 SMITH, J. B.:
Effect of thromboxane synthetase inhibitors on platelet function: enhancement by inhibition of phosphodiesterase
Thromb. Res. 28: 477 - 485 (1982)
- 131 SMITH, J. L., T. J. MARTIN:
Letter to the editor
Lancet 1: 1156 (1982)
- 132 STEGMEIER, K., W. AKPAN, W. BRÄUNING, C. PILL, F. H. SCHMIDT:
Effects of BM 13.177 on platelet functions and its antithrombotic activity
Thrombos. Haemostas. 50: 378
- 133 STEGMEIER, K., J. PILL, B. MÜLLER-BECKMANN, F. H. SCHMIDT, E.-C. WITTE, H. P. WOLFF, H. PATSCHEKE:
The pharmacological profile of the thromboxane A_2 antagonist BM 13.177. A new anti-platelet and anti-thrombotic drug
Thromb. Res. 35: 379 - 395 (1984)

- 134 TYLER, H. M., C. A. SAXTON, M. J. PARRY:
Administration to man of UK 37,248-01, a selective
inhibitor of thromboxane synthetase
Lancet 1 : 629 - 632 (1981)
- 135 UBATUBA, F. B., S. MONCADA, J. F. VANE:
The effect of prostacyclin (PGI_2) on platelet
behaviour. Thrombus formation in vivo and bleeding time
Thrombos. Haemostas. 40: 1 - 11 (1979)
- 136 VERMYLEN, J., L. O. CARRERAS, J. VAN SCHAEREN, G.
DEFREYN, S. J. MACHIN, M. VERSTRAETE:
Thromboxane synthetase inhibition as an antithrombotic
strategy
Lancet 1: 1073 - 1075 (1981)
- 137 VERSTRAETE, M.:
A pharmacological approach to the inhibition of
platelet adhesion and platelet aggregation
Haemostasis 12: 317 - 336 (1982)
- 138 WARLOW, C., A. CORINA, D. OGSTON, A. S. DOUGLAS:
The relationship between platelet aggregation and time
interval after venepuncture
Thromb. Diathes. Haemorrh. 31: 133 - 141 (1974)
- 139 WEBER, P. C., W. SIESS, B. SCHERER, E. HELD, H.
WITZGALL, R. LORENZ:
Arachidonic acid metabolites, hypertension and
arteriosclerosis
Klin. Wochenschrift 60: 479 - 488 (1982)
- 140 WEINTRAUB, M., K. CASE, B. KROENING, H. B. BORMAN:
Effects of piroxicam on platelet aggregation
Clin. Pharmacol. Ther. 23: 134 - 135 (1978)

- 141 WEISS, H. J.:
Platelet physiology and abnormalities of platelet function
New Engl. J. Med. 293: 531 - 540 (1975)
- 142 WEKSLER, B. B., S. B. PETT, D. ALONSO, R. C. RICHTER, P. STELZER, V. SUBRAMANIAN, K. TACK-GOLDMANN, W. A. GAY:
Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients
New. Engl. J. Med. 308: 800 -805 (1983)
- 143 WHITE, J. G.:
Current concepts of platelet structure
Am. J. Clin. Path. 71: 363 - 378 (1979)
- 144 WISEMAN, E. H.:
Pharmacologic studies with a new class of nonsteroidal anti-inflammatory agents - the oxicams - with special reference to piroxicam (feldene^R)
Am. J. Med. 72 (2) Suppl.: 2 - 8 (1982)
- 145 ZIMMERMANN, R., A. HOFFRICHTER, E. WALTER, W. EHLERS, K. ANDRASSY, P. D. LANG, G. SCHLIERF, E. WEBER, P. BARTH:
Orale Antikoagulation und Thrombozytenfunktion bei hypolipämischer Behandlung mit einem neuen Clofibrat-Analog (BM 15.075)
Dt. Med. Wschr. 14: 509 - 512 (1977)
- 146 ZUCKER, M. B., S. KIM, J. MC PHERSON, R. A. GRANT:
Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin
Brit. J. Haematol. 35: 535 - 549 (1977)

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Christoph Tore Salat
Geburtsdatum/-ort:	18. August 1960 in München
Ausbildung:	
1966 - 1970	Grundschule in München-Obermenzing
1970 - 1979	Humanistisches Gymnasium München-Pasing
Juni 1979	Abitur
Wintersemester 1979/80	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
August 1981	Physikum
August 1982	1. Staatsexamen
August 1984	2. Staatsexamen
Oktober/November 1985	3. Staatsexamen

Herrn Prof. Dr. E. Hiller möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung und Korrektur der Arbeit herzlich danken.

Herrn Dr. H. Riess gilt mein besonderer Dank für die wertvollen Anregungen, die gute Zusammenarbeit und die außergewöhnliche Einsatzbereitschaft.

Fräulein B. Reinhardt danke ich für die freundliche Unterstützung und technische Assistenz, vor allem bei der Durchführung der radioimmunologischen Thromboxanbestimmung.

